

**Chromosomale Veränderungen oberflächlicher
Harnblasenkarzinome
hinsichtlich ihrer Rezidivität und Multifokalität**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Holger Kujau

geboren am 25.10.1972 in Gera

Gutachter

- 1. PD Dr. K. Junker, Jena**
- 2. Prof. Dr. U. Claussen, Jena**
- 3. PD Dr. W. Werner, Plauen**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.11.2005

Verzeichnis der Abkürzungen:

BCG	- Bacillus Calmette-Guérin
bp	- Basenpaare
CCD	- charge coupled device = ladungsgekoppeltes Bauelement
CIS	- Carcinoma in situ
CGH	- Comparative Genomic Hybridization = Vergleichende Genomische Hybridisierung
DAPI	- 4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DBC1	- Deleted in bladder cancer gene 1 = in Blasenkarzinom deletiertes Gen 1
dim	- Verlust eines Chromosomenabschnittes
DOP	- Degenerate-oligonucleotide-primed = durch degenerierte Oligonukleotid- Primer
enh	- Gewinn eines Chromosomenabschnittes
FISH	- Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FR	- Fluoreszenzratio
ISH	- In-situ-Hybridisierung
LOH	- Loss of heterozygosity = Verlust der Heterozygotie
NRBT1	- Patienten mit unifokalem Tumor ohne Rezidiv
NRBTm	- Patienten mit multifokalen Tumoren ohne Rezidiv
PCR	- Polymerasekettenreaktion
PDD	- Photodynamische Diagnostik
RBT1	- Patienten mit unifokalem Tumor mit Rezidiv
RBTm	- Patienten mit multifokalen Tumoren mit Rezidiv
TSC1	- Tuberous-Sklerose-Gen
Tu-TUR	- transurethrale Tumoresektion der Harnblase

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Zusammenfassung</u>	4
2.	<u>Allgemeiner Teil</u>	6
2.1.	Einleitung	6
2.2.	Epidemiologie, Inzidenz und Ätiologie des Harnblasenkarzinoms	7
2.2.1.	Epidemiologie und Inzidenz	7
2.2.2.	Ätiologie	8
2.3.	Klassifikation des Harnblasenkarzinoms	10
2.3.1.	TNM-Einteilung	10
2.3.2.	Histologie	11
2.4.	Klinik der Harnblasenkarzinome	13
2.5.	Molekularbiologische Prognosefaktoren und genetische Veränderungen des Harnblasenkarzinoms	14
2.6.	Theorien der Rezidiventstehung beim Harnblasenkarzinom	20
2.7.	Diagnostik	22
2.7.1.	Urinzytologie	22
2.7.2.	Urethrozystoskopie	22
2.7.3.	Photodynamische Diagnostik	23
2.7.4.	Transurethrale Resektion	23
2.8.	Therapie	24
3.	<u>Zielstellung</u>	26
4.	<u>Material und Methoden</u>	27
4.1.	Patienten und Untersuchungsmaterial	27
4.2.	Methoden	28
4.2.1.	Einführung in die CGH	28
4.2.2.	DNA-Isolation	32
4.2.3.	DNA-Amplifikation	32
4.2.4.	DNA-Markierung	34
4.2.5.	Hybridisierung	35
4.2.6.	Detektion	36

4.2.7.	Auswertung	37
5.	<u>Ergebnisse</u>	41
5.1.	Allgemeine Ergebnisse	41
5.2.	Chromosomale Veränderungen der pTa-Tumoren	43
5.3.	Chromosomale Veränderungen nichtrezidivierender Tumoren	44
5.4.	Chromosomale Veränderungen rezidivierender Tumoren	45
5.5.	Vergleich nichtrezidivierender mit rezidivierenden Tumoren	46
5.6.	Chromosomale Veränderungen abhängig von der durchschnittlichen rezidivfreien Zeit	48
5.7.	Chromosomale Veränderungen abhängig von der Multifokalität	50
5.8.	Chromosomale Veränderungen hinsichtlich des Differenzierungsgrades	52
5.9.	Geschlechtsspezifische Veränderungen	54
6.	<u>Diskussion</u>	57
6.1.	Morphologische und biologische Tumorkriterien der Rezidivität	57
6.2.	Chromosomenveränderungen der pTa-Tumoren	58
6.3.	Chromosomale Veränderungen der rezidivierenden und nichtrezidivierenden Tumoren	60
6.4.	Chromosomale Veränderungen in Bezug auf die durchschnittliche rezidivfreie Zeit	72
6.5.	Chromosomale Veränderungen hinsichtlich der Anzahl der Primärtumoren – Multifokalität	73
6.6.	Chromosomale Veränderungen abhängig vom Differenzierungsgrad	76
6.7.	Geschlechtsspezifische Unterschiede chromosomaler Aberrationen	77
7.	<u>Schlußfolgerungen</u>	78
	Literaturverzeichnis	80
	Anhang	97
	- Tabellen mit Patienten- und Tumordaten	
	- Lebenslauf	
	- Danksagung	
	- Ehrenwörtliche Erklärung	

1. Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom ist der zweithäufigste bösartige Tumor des Urogenitaltraktes, wobei beim oberflächlichen Karzinom eine hohe Rezidivfrequenz bekannt ist. Bis jetzt gibt es keine verlässlichen Parameter, um das individuelle Rezidivrisiko für einen bestimmten Tumor einzuschätzen. Allerdings ist dieses Risiko bei Patienten mit multiplen Tumoren deutlich erhöht.

In der Tumorgenese werden spezifische genetische Veränderungen für die Initiation, Progression und Rezidivität der Karzinome verantwortlich gemacht. Ein Screening des Genoms auf solche Veränderungen ermöglicht die Methode der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (CGH, Comparative Genomic Hybridization). In dieser Arbeit wurden 25 nichtrezidivierende und 28 rezidivierende Harnblasenkarzinome pTaG1-2 mittels dieser Methode untersucht. Ziel war es, typische Aberrationsmuster herauszufinden, durch welche sich rezidivierende von nichtrezidivierenden Tumoren sowie primär monofokale von multifokalen Tumoren unterscheiden, um somit das Risiko eines Rezidives besser beurteilen zu können.

Monofokale Tumoren rezidierten mit 43 % seltener als multifokale Tumoren mit 64 %. Weiterhin hatten rezidivierende Tumoren bei monofokalem Primum mit 17,5 Monaten eine längere durchschnittliche rezidivfreie Zeit als bei einem multilokulären Primärtumor mit 10,5 Monaten.

Die Tumoren zeigten typische Chromosomenveränderungen. Es traten Verluste an den Chromosomen 9 (60 %), 10 (11 %), 11 (19 %), 18 (9 %) und Y (26 %) sowie Gewinne an den Chromosomen 1 (11 %), 7 (9 %), 8, 13 (je 11 %) und 17 (19 %) auf. Rezidivierende Tumoren hatten im Gegensatz zu nichtrezidivierenden Tumoren erhöhte Verluste an 10q (18 % vs. 4 %) und am Chromosom 11 (25 % vs. 12 %) sowie Gewinne am Chromosom 17 (25 % vs. 12 %).

Es zeigte sich, daß Tumoren mit abnehmender durchschnittlicher rezidivfreier Zeit deutlich mehr Gesamtaberrationen akkumulierten (bei bis zu 6 Monaten 3,6 Aberrationen vs. bei mehr als 24 Monaten 1,2 Aberrationen pro Tumor). Tumoren mit einem kurzen Rezidivintervall hatten häufiger Verluste am Chromosom 11 sowie Zugewinne an den Chromosomen 1, 11 und 17.

Die multifokalen Tumoren bildeten im Gegensatz zu den monofokalen vermehrt Zugewinne am Chromosom 1 (18,2 % vs. 3,7 %) sowie Verluste an 8p

(13,6 % vs. 0 %), 10q (18,2 % vs. 7,4 %) und Chromosom 11 (22,7 % vs. 14,8 %) aus, wobei die Veränderungen an den Chromosomen 1 und 8 eher einen Einfluß auf die Invasivität zu haben scheinen. Chromosom 7 zeigte Gewinne nur bei monofokalen Tumoren, wobei 5 von 6 Tumoren nichtrezidivierend waren.

Gut differenzierte Tumoren unterschieden sich von mäßig differenzierten Tumoren durch Gewinn an dem Chromosom 17 bei 23 % bzw. 11 % sowie Verluste an dem Chromosom 9 mit 69 % bzw. 44 %, Chromosom 11 mit 14 % bzw. 28 % und Chromosom Y mit 31 % bzw. 11 %.

Die Tumoren weiblicher Patienten entwickelten im Gegensatz zu denen männlicher Patienten eine deutlich erhöhte Gesamtaberrationszahl, wobei Verluste an 10q überdurchschnittlich häufiger waren (27 % vs. 5 %).

In den Untersuchungen wurden bestimmte Chromosomenveränderungen ermittelt, die eine Rolle bei der Rezidivität (-10q, -11, +17) sowie einem verkürzten rezidivfreien Überleben (-11, +11q, +17) spielen können. Dazu hat sich die Methode der CGH bewährt, wobei natürlich nur der Verlust oder Gewinn größerer Chromosomenabschnitte detektiert werden kann. Zukünftig sollten die erwähnten Aberrationen auf das Vorhandensein möglicher Gene untersucht werden, welche bei Verlust oder Aktivierung die Rezidivität eines Tumors beeinflussen.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Einleitung

Das Harnblasenkarzinom ist der zweithäufigste bösartige Tumor des Urogenitaltraktes und steht als Todesursache beim Mann an 6. und bei der Frau an 8. Stelle (Jocham 2003).

70-80 % dieser Tumoren sind bei Erstdiagnose oberflächlich begrenzt (pTa/1), wobei 60-80 % der Patienten nach kompletter Resektion nach 4 Jahren ein Rezidiv entwickeln (Böhle and Jocham 1998; Stein et al. 1998). Das Risiko eines Progresses ist bei noninvasiven Tumoren pTa bedeutend kleiner (≥ 4 %) als bei pT1-Tumoren (30 %) (Koontz et al. 1985). Patienten mit multiplen Tumoren haben ein doppeltes Risiko eines Rezidives (Parmar et al. 1989).

Die Standardtherapie ist die transurethrale Resektion.

Derzeit gibt es im klinischen Alltag keine verlässlichen Prognosefaktoren, um das Rezidiv- und Progressionsrisiko oberflächlicher Harnblasenkarzinome vorhersagen zu können.

Die Nachsorge des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms besteht zum einem in der Urinzytologie, welche zumindest bei hochdifferenzierten Tumoren eine schlechte Sensibilität erreicht. Somit ist die regelmäßige diagnostische Urethrozystoskopie immer noch Goldstandard, was jedoch für den Patienten eine hohe körperliche und psychische Belastung sowie für die Gesellschaft einen großen finanziellen und personellen Aufwand bedeutet.

Vielfältige genetische Analysen der Harnblasentumoren konnten spezifische genetische Alterationen definieren. Hierzu gehören Verluste der Chromosomen 9, 17 und Y. Es konnten Korrelationen zwischen spezifischen Veränderungen und oberflächlichen bzw. invasiven Tumoren gefunden werden.

Es stellte sich somit die Frage, ob Chromosomenveränderungen existieren, welche in den Primärtumoren nachgewiesen werden können und typisch für rezidivierende Tumoren sind. Gibt es chromosomale Unterschiede primär monofokaler und multifokaler Tumoren, welche unter anderem mit der Rezidivhäufigkeit korrelieren? Gibt es genetische Marker, welche im Zusammenhang mit der durchschnittlichen Rezidivzeit stehen?

Durch derartige chromosomale Marker würde eine Möglichkeit eröffnet, um bei Patienten mit Tumoren geringen Rezidivrisikos die Zeitintervalle einer invasiven Nachsorge mittels Zystoskopie auszudehnen. Andererseits könnten Patienten mit einem deutlich erhöhten Rezidivrisiko ermittelt werden, welche von einer intravesikalen Therapie (BCG- Bacillus Calmette-Guérin, Chemotherapie) profitieren würden.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb zu ermitteln, ob spezifische genetische Veränderungen nachweisbar sind, die eine Vorhersage des Rezidivrisikos oberflächlicher Tumoren erlauben.

2.2. Epidemiologie, Inzidenz und Ätiologie des Harnblasenkarzinoms

2.2.1. Epidemiologie und Inzidenz

Das Harnblasenkarzinom ist nach dem Prostatakarzinom die zweithäufigste maligne Tumorerkrankung des Urogenitaltraktes. Unter allen bösartigen Tumoren ist es die vierthäufigste beim Mann und die sechsthäufigste bei der Frau. Als Todesursache steht es beim Mann an 6. und bei der Frau an 8. Stelle (Jocham 2003). Die Inzidenz steigt kontinuierlich im Alter an, bei den Männern von 10 bei den 40-jährigen auf ca. 200 bei den über 80-jährigen, 3-4 mal so häufig wie bei den Frauen. Weniger als 5 % der Tumoren treten in den ersten 3 Lebensjahrzehnten auf (Cutler and Young 1975). Das Blasenkarzinom verursacht ca. 3,5 % aller Todesfälle durch Krebs, wobei die Mortalität in verschiedenen Industrieländern beträchtlich variiert (2,4 % in Japan; 5,5 % in Mitteleuropa vs. 7,9 % in Südafrika) (Morrison and Cole 1976). Es gibt auch Unterschiede in der Inzidenz bei verschiedenen Rassen: weiße Amerikaner erkranken ca. doppelt so häufig wie schwarze Amerikaner (Annual Cancer Statistics Review 1987).

2.2.2. Ätiologie

Aromatische Amine sind für die Verursachung von Transitionalzellkarzinomen bekannt. Rehn zeigte bereits 1895 einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Blasenkarzinomhäufigkeit bei Arbeitern mit Anilinfarbenexposition (Jocham 2003). Erwiesen ist es für Stoffe wie 2-Naphtylamin, 4-Aminobiphenyl, 4-Nitrobiphenyl, 2-Amino-1-Naphthol und Benzidin, wahrscheinlich auch Abgase, Kohleruß, Aldehyde wie Acrolein in chemischen Farben, Gummi und Industrietextilien (Messing and Catalona 1997).

Aromatische Amine werden vorwiegend in der Leber in karzinogene Stoffe umgewandelt, so 2-Naphtylamin in das Karzinogen N-Hydroxy-2-aminonaphtylamin sowie 12 weitere Metaboliten (Kadlubar et al. 1981). Der Abbau der Stoffe vollzieht sich auf 2 Wegen, welche in einem Gleichgewicht stehen. Einerseits werden sie inaktiviert durch N-Azetylierung mit nachfolgender Hydroxylierung, wobei die N-Azetyltransferase einer individuell unterschiedlichen genetischen Variabilität und damit Verfügbarkeit unterliegt (Jocham 2003). Menschen mit einer niedrigen Enzymaktivität sollen ein gesteigertes Risiko für die Entwicklung eines Urothelkarzinoms haben (Risch et al. 1995). Andererseits können aromatische Amine einer primären N-Hydroxylierung mit nachfolgender N-Glukuronidbildung unterliegen, wobei die Entfaltung der Kanzerogenität auf die Urothelzellen erst durch Dekonjugation, z.B. durch die β -Glucuronidase, erfolgt.

Ebenfalls sollen Urin-pH und das Enzym Prostaglandin-Endoperoxid-Synthetase die Entstehung kanzerogener Stoffe beeinflussen (Jocham 2003). Die Gluthation-S-Transferase M1 inaktiviert Kanzerogene. Raucher mit einem vollständigen Verlust des entsprechenden Genes haben ein 1,8-fach höheres Risiko einer Transitionalzellkarzinomentstehung als Raucher mit mindestens einem Allel (Bell et al. 1993).

Zigarettenraucher haben ein ca. 4-fach erhöhtes Risiko an Blasentumoren zu erkranken, wobei eine hohe Korrelation zu Anzahl der Zigaretten pro Tag und Teergehalt besteht. Verantwortlich werden auch hier aromatische Amine wie Nitrosamine, 2-Naphtylamin und 4-Aminobiphenyl gemacht (Hoffman et al. 1969, Morrison 1984; Clavel et al. 1989).

Bestimmte Medikamente können bei chronischem Gebrauch einen Blasentumor induzieren. So kann Phenazetin neben einer interstitiellen Nephritis zu Tumoren vor

allem der oberen Harnwege führen (Piper et al. 1985). Bei der Cyclophosphamidbehandlung kam es zu einem überdurchschnittlich hohen Auftreten urothelialer Karzinome vor allem der Harnblase (Silverman et al. 1992). Mutmaßliche Karzinogene stellen Kaffeekonsum und künstliche Süßstoffe wie Saccharin und Cyclamat dar. Bei chronischen Infekten der Harnwege werden dabei entstehende Nitrosamine für ein erhöhtes Auftreten maligner Tumoren verantwortlich gemacht. So entstehen gehäuft Plattenepithelkarzinome bei Dauerkatheterträgern, Blasensteinleiden und chronischer Bilharziose. Ein weiterer Risikofaktor kann eine Balkannephritis sein. Inwieweit eine HPV-Infektion und hereditäre Faktoren eine Rolle spielen, ist noch ungeklärt (Jocham 2003).

Anzunehmen ist eine multifaktorielle Genese der Karzinome, d.h. das Zusammenspiel mehrerer Risikofaktoren, die ein Karzinom über schrittweise Veränderungen erst entstehen lassen. Über die obengenannten Abbauvorgänge entstehen im Urin Arylnitriten, welche die DNA der Urothelzellen verändern (Kadlubar et al. 1978) und somit Auslöser der malignen Transformation sein können.

Die klassische, in Experimenten erforschte, chemische Karzinogenese verläuft über 3 Schritte:

1. Initiation - irreversible genetische Veränderungen werden geschaffen, welche aber noch nicht zu einer Transformation in eine maligne Zelle führen.
2. Promotion - weitere, der Initiation folgende genetische Veränderungen führen zu einer Umwandlung der Zelle in einen malignen Phänotyp.
3. Progression - die nachfolgende DNA-Schädigung befähigt die Zelle zu einer ungehemmten Zellteilung, Synthese von Produkten für Angiogenese, Invasion (Durchbrechen der Basalmembran), Zellmotilität und Metastasierung.

In vivo sind die drei Schritte nicht gut voneinander abgrenzbar (Messing and Catalona 1997).

2.3. Klassifikation des Harnblasenkarzinoms

2.3.1. TNM-Einteilung

Die Einteilung der anatomischen Tumorausbreitung TNM sowie die Beurteilung des Differenzierungsgrades G erfolgen nach den Richtlinien der Internationalen Union gegen den Krebs (UICC 1997 bzw. 2003).

T Primärtumor

- TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T0 kein Anhalt für Primärtumor
- Ta nichtinvasiver papillärer Tumor
- Tis Carcinoma in situ (flat tumor)
- T1 Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
- T2 Tumor infiltriert Muskulatur
 - T2a oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
 - T2b tiefe Muskulatur (äußere Hälfte)
- T3 Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe
 - T3a mikroskopisch
 - T3b makroskopisch (extravesikaler Tumor)
- T4 Tumor infiltriert benachbarte Organe
 - T4a Infiltration von Prostata, Vagina oder Uterus
 - T4b Infiltration von Becken- oder Bauchwand

Zusätze: m bei multilokulären Prozessen
is bei Carcinoma in situ

N Regionäre Lymphknoten

entsprechen Lymphknoten unterhalb der Iliaca-Communis-Bifurkation

- NX Lymphknoten nicht beurteilbar
- N0 keine regionären Lymphknoten
- N1 solitäre Lymphknotenmetastase ≤ 2 cm
- N2 solitäre Lymphknotenmetastase > 2 bis ≤ 5 cm
oder multiple Lymphknotenmetastasen ≤ 2 cm
- N3 Metastase(n) in Lymphknoten > 5 cm

M Fernmetastasen

- MX Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
- M0 Keine Fernmetastasen nachgewiesen
- M1 Fernmetastasen nachgewiesen

Die pathologische Einteilung pTNM entspricht der TNM.

G Differenzierung

- G1 gut differenziert
- G2 mittelgradig differenziert
- G3 schlecht differenziert

2.3.2. Histologie

Das normale Urothel ist aus 3-7 Zellagen aufgebaut, bestehend aus basalmembrannah gelegenen Intermediärzellen mit exzentrisch gelagerten Zellkernen sowie einer superfiziellen Schicht polygonaler sogenannter Regenschirmzellen. Die epitheliale Hyperplasie äußert sich in einer erhöhten Anzahl von Zellagen bei normaler Zellarchitektur und –morphologie. Die Metaplasie ist meist eine Plattenepithelmetaplasie, wobei über Gewebsproliferation das normale Urothel durch ausgereiftes, nicht verhornendes Plattenepithel ersetzt wird. Gefunden werden solche Veränderungen ohne Krankheitswert bei ca. 50 % aller Frauen bevorzugt im Trigonumbereich und bei weniger als 10 % aller Männer. Bei einer Leukoplakie findet sich eine Plattenepithelmetaplasie mit Verhornung und zellulären Atypien. Sie wird als Präkanzerose für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms mit einer Entartungswahrscheinlichkeit von ca. 20 % angesehen.

Ohne Krankheitswert sind Von-Brunn-Zellnester, von der Basalmembran ausgehende, in die Submukosa hineinragende Urothelzellinseln sowie die ähnlich erscheinende Cystitis cystica, bei welcher in den Zellinseln eosinophiles Material eingeschlossen ist. Differentialdiagnostisch muß man die Cystitis follicularis abgrenzen, bei der durch chronische Entzündungen submucöse Lymphfollikel vorliegen. Die Cystitis glandularis, eine mögliche Präkanzerose des

Adenokarzinoms, hat das histologische Bild einer Cystitis cystica, wobei das Urothel eine glanduläre Metaplasie erfahren hat. Das nephrogene Adenom, histologisch unreifen Sammelrohren ähnlich, tritt selten als Metaplasie bei chronischen Blasenreizungen auf. Das invertierte Papillom ist eine benigne Proliferation, welche entweder trabekulär (Ursprung Basalzellen) oder glandulär (Ursprung Intermediärzellen) als papilläre Formation im fibromuskulären Stroma imponiert. Das glanduläre invertierte Papillom gilt als Präkanzerose.

Als urotheliale Dysplasie bezeichnet man Zellkernveränderungen (groß, rund, basal gelegen) ohne Zunahme von Zellagen oder Mitosefiguren. Sie wird unterteilt in leichte, mittelgradige und schwere Dysplasie, wobei die Unterscheidung der schweren Dysplasie zum Carcinoma in situ oft schwerfällt. Die mittelgradige und vor allem schwere Dysplasie ist vom biologischen Verhalten dem Carcinoma in situ ähnlich.

Das Carcinoma in situ ist ein anaplastischer urothelialer Tumor mit schwerer Dysplasie der Zellen, ohne exophytisch papilläres Wachstum und ohne Überschreitung der Basalmembran. Von der schweren Dysplasie unterscheidet es sich durch den Verlust der Epithelschichtung. Es ist ein Progreßrisiko zur Muskelinvasion von 38-83 % bekannt, ebenso eine Koinzidenz mit papillären und soliden Harnblasentumoren in 20-75 % und eine erhöhte Inzidenz im Zusammenhang mit multifokalem Tumorwachstum.

Das Transitionalzellkarzinom macht mehr als 90 % aller Blasenkarzinome aus. Morphologisch kann es papillär exophytisch (70 %), solid-infiltrierend sowie knotig (10 %) sein oder auch aus Mischformen (20 %) bestehen. Flache intraepitheliale Tumoren sind Carcinomata in situ gleich zu setzen. Die Kennzeichen der Malignität sind vermehrte Zellagen, eine aufgehobene Polarität der Zellen, eine vergrößerte Kern-Plasma-Relation, prominente Nukleolen, verklumptes Chromatin sowie eine erhöhte Anzahl an Mitoseraten. Das Durchbrechen der Basalmembran ist Kennzeichen der Invasivität und Potenz der Metastasierung. In dem Tumor können auch metaplastische Elemente vorkommen wie Plattenepithel, Spindelzellen und adenoide Zellen mit zum Teil maligner Transformation. Die Tumoren werden je nach histologischem Erscheinungsbild in gut-, mittel- und schlechtgradige Tumoren eingeteilt. Der Tumorgrad hat eine enge Korrelation zum Tumorstadium. Höhergradige Tumoren gehen eher mit einer Invasion des Blasenmuskels einher, was wiederum eine schlechtere Prognose bedeutet.

Das Plattenepithelkarzinom ist in unseren Breiten eher selten (3-6 %), ätiologisch kommen chronische Entzündungszustände der Blase z.B. durch Harnblasenkatheter oder Bilharziose in Betracht. Die Plattenepithelkarzinome sind bei der Erstdiagnose meist schon muskelinvasiv und mittelgradig bis schlecht differenziert. Histologisch sind verhornende Plattenepithelien kennzeichnend.

Das primäre Adenokarzinom der Harnblase (3 %) hat seinen Ursprung meist im Urachus oder einer Blasenektrophie. Es können urotheliale, plattenepitheliale oder auch sarkomatöse Anteile enthalten sein.

Weitere seltene Tumoren der Harnblase sind das primäre maligne Melanom, neuroendokrine Tumoren (Phäochromozytom, Karzinoidtumoren, kleinzellige Tumoren) sowie nichtepitheliale Tumoren wie Leiomyosarkome, Rhabdomyosarkome und Plasmozytom. Sekundär können Metastasen die Blase besiedeln (Magen-, Mamma-, Bronchialkarzinom, Melanom) oder Infiltration aus der Umgebung vorliegen (Tumoren der weiblichen Genitalorgane, Prostata, Dickdarm) (Jocham 2003).

Die histologische Einteilung erfolgt nach der ICD-O-M (International Classification of Diseases Oncologie, Morphologie).

2.4. Klinik der Harnblasenkarzinome

70-80 % aller Urothelkarzinome der Harnblase werden zum Zeitpunkt der Erstdiagnose als oberflächlich (pTa, pT1) klassifiziert. 60-80 % dieser Patienten mit oberflächlichem Harnblasenkarzinom erleiden nach kompletter transurethraler Resektion innerhalb von 4 Jahren Tumorrezidive (Böhle and Jocham 1998; Stein et al. 1998). Der Einfluß von Tumorstadium und Differenzierung auf die Rezidivhäufigkeit wird in verschiedenen Studien unterschiedlich diskutiert (Di Silverio et al. 1992; Kurth et al. 1992; Neuhaus et al. 1999).

Die Progrediézwahrscheinlichkeit von pTa-Tumoren ist mit mehr als 4 % deutlich niedriger als die der pT1-Tumoren mit 30 % (Koontz et al. 1985). Ebenso ist die Progressionsrate von pTaG3-Tumoren mit 28 % deutlich höher als bei pTaG1-Tumoren mit 2,1 % (Chen et al. 1996). Dies ist bedeutsam, da 10-30 % der Rezidive oberflächlicher Tumoren eine Abnahme der Differenzierung zeigen (Wittekind and Nenning 1997).

Die Prognose der oberflächlichen Harnblasenkarzinome wird auch von morphologischen Kriterien beeinflusst. Multilokuläre bzw. große Primärtumoren haben ein deutlich erhöhtes Risiko, ein Rezidiv bzw. einen Progreß zu entwickeln (Heney et al. 1983; Fitzpatrick et al. 1986; Pagano et al. 1987; Parmar et al. 1989; Kurth et al. 1992).

Die invasiven Tumoren sind in ihrer Prognose gegensätzlich zu den oberflächlichen zu sehen. Eine Metastasierung tritt bei pT1-Tumoren zu 5 % und bei pT2-4 zu 30% bis größer 60 % auf (Jocham 2003). Die Prognose metastasierender Tumoren ist schlecht. Während Patienten mit einem solitären Lymphknotenbefall kleiner 2 cm (pN1) nach radikaler Zystektomie und Lymphadenektomie eine 3-Jahresüberlebensrate von 30 % haben (Roehrborn et al. 1991), ist die Prognose bei ausgedehntem Tumorbefall pN2-M1 schlecht (5-Jahresüberlebensrate 0-5 %) (Smith and Whitmore 1981).

Das Carcinoma in situ ist häufig mit einem invasiven Tumor assoziiert (Prout et al. 1983), weiterhin ist ein Progreß in bis zu 78 % der Fälle zu erwarten (Lamm 1992). Bei 34 % der Patienten mit Zystektomie wegen Carcinoma in situ ließ sich bereits eine Mikroinvasion nachweisen (Zincke et al. 1985).

2.5. Molekularbiologische Prognosefaktoren und genetische Veränderungen des Harnblasenkarzinoms

Es wurden viele Prognosemarker untersucht, welche Aussagen bezüglich Rezidivität, Progreß, Metastasierung und/ oder Überleben treffen sollen. Für klinische Fragestellungen werden üblicherweise das Tumorstadium und die Differenzierung herangezogen, was aufgrund der ausgeprägten Tumorerheterogenität des Harnblasenkarzinoms als nicht ausreichend erachtet werden kann. Eigenschaften der Tumoren wie Multilokalität, Tumorgroße, Rezidivhäufigkeit und rezidivfreie Zeit können ebenfalls keine ausreichende Differenzierung in dieser Frage erbringen.

In der Tumorgenese treten spezielle Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene auf, welche unter anderem durch Aktivierung von Onkogenen und Alterationen von Tumorsuppressorgenen zu einer Proliferationssteigerung und

malignen Transformation führen können. Für einige dieser Tumormarker ist ein prognostischer Wert beim Harnblasenkarzinom beschrieben.

Weiterhin werden beim Harnblasenkarzinom charakteristische Chromosomenveränderungen beschrieben. Schon frühzeitig wurden Verluste am Chromosom 9 mit 50-67 % nachgewiesen (Tsai et al. 1990; Cairns et al. 1993; Sandberg and Berger 1994).

Durch die CGH wurde in den letzten Jahren die Möglichkeit eröffnet, Chromosomenveränderungen eines Tumors wie Verluste und Zugewinne über das gesamte Genom zu ermitteln. Es stellten sich dabei deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorstadien heraus. In vergleichenden Untersuchungen zwischen pTa- und pT1-Tumoren betrug die durchschnittliche Anzahl der Aberrationen 2,3 vs. 6,5 (Richter et al. 1997) bzw. 3,7 vs. 9,8 pro Tumor (Simon et al. 1998).

Es zeigten sich bei den pTa-Tumoren Verluste am Chromosom 9 zu 57 % (16 von 28 Tumoren), darunter 10 Tumoren mit Gesamtverlust des Chromosoms, einen Tumor mit Verlust am kurzen Chromosomenarm 9p sowie 5 Tumoren mit Verlusten am langen Chromosomenarm 9q (Richter et al. 1997) bzw. zu 55 % mit 7 Gesamtverlusten von Chromosom 9 und 4 Tumoren mit Teilverlusten an 9p bzw. 9q (Simon et al. 1998). Auf 9p21 liegt der INK4A/ ARF-Lokus, welcher für die Gene p16^{INK4A} und p19^{ARF} kodiert. Beide Gene bewirken in der Zellzyklusregulation über Beeinflussung von Rb1 (Retinoblastomgen) bzw. p53-Gen einen Arrest in der G1-Phase, ein Wirkungsverlust kann somit zu einem Wachstumsvorteil von Tumoren führen (Wagener 1999). Bei 121 Patienten mit pTa/1-Tumoren korrelierte eine homozygote Deletion von INK4A statistisch signifikant mit einem kurzen rezidivfreien Überleben sowie mit der Tumorgroße. Weiterhin konnte bei einigen Tumoren eine Methylierung der p16-Promoterregion ermittelt werden mit folglich negativem p16-Phänotyp (Orlow et al. 1999). Ein weiteres mögliches Tumorsuppressorgen ist TSC1 (Tuberous-Sclerosus-Gen) auf 9q34, über eine Korrelation zur Rezidivität wird berichtet (Edwards et al. 2002).

Weiterhin gab es bei Richter et al. in mehr als 2 Fällen Verluste am Chromosom Y (28 %) und Zugewinne an 1q (14 %) (Richter et al. 1997). Simon et al. beschrieben in mehr als 2 Fällen Verluste an 5q (20 %) und 8q (15 %) sowie Gewinne an den Chromosomen 17 (30 %), 20q (15 %) und an 11q13 inklusive 3 Amplifikationen (25 %) (Simon et al. 1998). Eine Überexpression von Cyclin D1 auf 11q13 war

assoziiert mit einer erhöhten Rezidivität oberflächlicher Harnblasenkarzinome (Shin et al. 1997).

In pT1-Tumoren zeigten sich eine deutlich höhere Anzahl chromosomaler Alterationen. Im Gegensatz zu pTa-Tumoren traten gehäuft Gewinne an 1q, 8q und 17q sowie Verluste bei 2q, 8p, 10q, 11p, 11q und 17p auf (Richter et al. 1997; Simon et al. 1998). Dabei repräsentiert das auf 17p gelegene Tumorsuppressorgen p53 das am häufigsten alterierte Gen bei malignen Tumoren (Greenblatt et al. 1994). Es kodiert für ein Protein, welches den Ablauf des Zellzyklus reguliert durch Blockade der Mitose in der späten G1-Phase, die schließlich zur Reparatur von genetischen Läsionen mit karzinogenem Potential benutzt wird bzw. wodurch Zellen mit irreversibler DNA-Schädigung in die Apoptose überführt werden (Brauers and Jakse 1996; Wagener 1999). Mutiertes p53 akkumuliert in Zellen und kann immunohistochemisch nachgewiesen werden (Banks et al. 1986). Die Korrelation des Verlustes von 17p und/ oder Nachweis von alteriertem p53 mit Tumorstadium und Entdifferenzierung der Harnblasenkarzinome ist bekannt (Dalbagni et al. 1993; Kuczyk et al. 1994; Moch et al. 1994). Die prognostische Relevanz von p53 bei oberflächlichen Tumoren wird konträr betrachtet. Während einerseits einer p53-Akkumulation ein prognostischer Wert bezüglich Progreß und Rezidivität oberflächlicher Tumoren zugesprochen wird (Sarkis et al. 1993; Kuczyk et al. 1994; Schmitz-Dräger B.J. 1995; Schulz et al. 1998; Yan et al. 2002), kann dies von anderen Autoren nicht bestätigt werden (Pfister et al. 1999; Zlotta et al. 1999).

Amplifikationen werden gehäuft beschrieben. Bei pTa-Tumoren traten diese an 11q13 (Cyclin D1) auf. Bei pT1-Tumoren fanden sie sich in mehr als einem Fall bei 1q22-24, 3p24-25, 6p22, 8q21-22, 10p12.1-14 und 12q15-21 (Richter et al. 1997; Simon et al. 1998).

Im Vergleich zu pTa-Tumoren zeigte sich bei pT1-Tumoren eine erhöhte Anzahl chromosomaler Aberrationen, was für eine erhöhte genetische Instabilität dieser Tumoren spricht. Die genannten Chromosomenaberrationen könnten in der Entwicklung bzw. Progression der Tumoren eine Rolle spielen (Richter et al. 1997; Simon et al. 1998). Dies wird durch die Beobachtung gestützt, daß invasive Tumoren gleiche Chromosomenaberrationen wie pT1-Tumoren innehaben. Es werden lediglich zusätzliche Verluste bei 15q und Gewinne an 7p und Xq beschrieben (Knowles 2001).

Hervorstechend waren die Unterschiede am Chromosom 9 in den Untersuchungen von Richter et al., dort gab es bedeutend mehr Verluste bei pTa- als bei pT1-Tumoren (insgesamt 57 % vs. 28 %).

Dazu existieren folgende Hypothesen:

1. Es gibt verschiedene Entwicklungswege der invasiven und nichtinvasiven Harnblasenkarzinome mit einem unterschiedlichen Spektrum genetischer Veränderungen (Spruck et al. 1994).
2. pTa-Tumoren mit Verlust von Chromosom 9 haben ein geringeres Risiko eines Progresses (Richter et al. 1997).

Weiterhin können aber auch methodische Gründe Ursache für diese Abweichungen sein, zumal von Simon et al. keine entsprechenden Unterschiede aufgezeigt werden konnten (Simon et al. 1998).

Nichtinfiltrierende gut differenzierte Harnblasenkarzinome (pTa) scheinen sich in ihren klinischen wie genetischen Eigenschaften deutlich von den die Submukosa infiltrierenden Tumoren (pT1) abzugrenzen (Sauter and Mihatsch 1998).

In der Literatur wird für weitere Tumormarker ein prognostischer Wert beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom beschrieben.

Ein Marker für die proliferative Aktivität eines Tumors ist das Antigen Ki67/ MIB-1. Multivariat wird es als ein unabhängiger Parameter für Rezidivität und krankheitsfreies Überleben beschrieben (Gontero et al. 2000; Pich et al. 2002). Ein Verlust der Expression des Zelladhäsionsmoleküles E-Catherin ist mit Invasivität und erniedrigtem Überleben verknüpft (Bringuier et al. 1993). Bei oberflächlichen Tumoren besteht eine Korrelation zur Rezidivität (Lipponen and Eskelinen 1995).

Die Ratio von BCL2 (B-cell leukemia 2, unterdrückt Apoptose) und BAX (BCL2-associated X protein, fördert Apoptose) ist eng mit der rezidivfreien Zeit verbunden. Bei einer Ratio > 1 betrug sie 3 Monate und bei < 1 48 Monate (p=0.0001). Einen ähnlichen Einfluß hatte auch die Expression von BCL-X (BCL2 related gene) und Livin α (Gazzaniga et al. 2003).

Das Oncogen H-ras (Harvey murine sarcoma virus oncogene) auf 11p15 codiert für p21, ein für die intrazelluläre Signaltransduktion zuständiges Membranprotein. Es wird über eine Verdoppelung des Rezidivrisikos bei primär solitären pTa/1-Tumoren berichtet, welche p21 exprimieren (Fontana et al. 1996). Weitere Marker mit vermutetem prognostischen Wert sind: u-PA (Urokinase)(Hasui et al. 1994; Hasui et

al. 1996), CD44 (Lipponen et al. 1998; Toma et al. 1999), c-erbB1 (Mellon et al. 1995; Yan et al. 2002), HMSH2 (Humane mismatch repair gene) bzw. HMLH1 (MutL (E. coli) homolog 1) (Catto et al. 2003), VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Crew et al. 1999) und p27^{KIP} (Cyclin dependent kinase inhibitor 1B) (Sgambato et al. 1999).

Die Mehrzahl der Harnblasenkarzinome entwickelt sich über aufeinander folgende Transformationsschritte mit folgenden 2 typischen Sequenzen:

- (1.) normales Urothel ⇒ Hyperplasie ⇒ Papillom mit fokaler Zellatypie
⇒ Papillom mit oberflächlichem Karzinom ⇒ papilläres invasives Karzinom
- (2.) normales Urothel ⇒ Dysplasie ⇒ primäres Carcinoma in situ
⇒ invasives Karzinom

(Jocham 2003)

Dabei zeigen die Tumoren beider Entwicklungswege typische genetische Veränderungen. Papilläre pTa-Tumoren weisen oft Verluste am Chromosom 9 auf (36-57 %) (Spruck et al. 1994; Richter et al. 1997), welches als Primärveränderung bei Harnblasenkarzinomen gilt. Verlust am Chromosom 9 wird oft als einzige chromosomale Alteration bei diesen Tumoren nachgewiesen (Knowles 1999a). PTa-Tumoren gelten als genetisch stabil, gehen selten in einen Progreß über (Koontz et al. 1985) und rezidivieren häufig (Neuhaus et al. 1999).

CIS (Carcinoma in situ) hingegen weisen Alterationen von p53 mit 65 % deutlich häufiger als pTa-Tumoren mit 3 % auf (Spruck et al. 1994). Dies bedeutet für diese Tumoren eine erhöhte genetische Instabilität (Hartmann et al. 2002). So scheinen CIS eine Vorläuferveränderung der invasiven Tumoren zu sein, da sie häufig simultan auftreten und CIS in bis zu 78 % invasiv werden (Prout et al. 1983; Lamm 1992). Die Verluste am Chromosom 9 differieren beim CIS zwischen 12 % (Spruck et al. 1994) und 75 %, so daß die Rolle des Chromosom 9 bezüglich des papillären Wachstums noch unklar erscheint (Hartmann et al. 2002).

Die Entwicklung der pTa-Tumoren über Hyperplasien sowie der CIS über Dysplasien mit entsprechend gleichartigen genetischen Veränderungen ist in Studien

beschrieben (Hartmann et al. 2002; Obermann et al. 2003). Die Entwicklungssequenzen mit den typischen Chromosomenaberrationen stellt die Abbildung 1 dar.

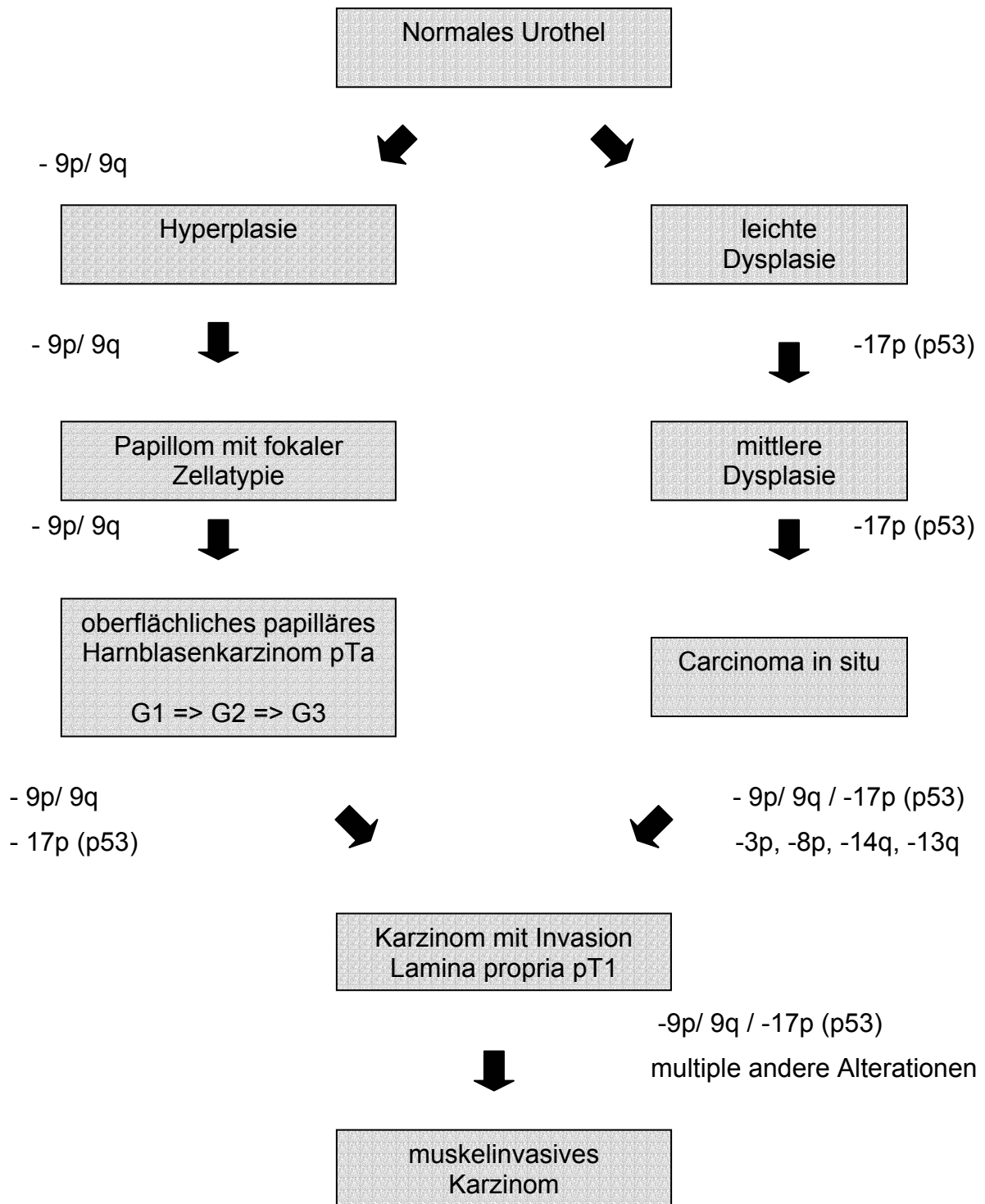


Abb. 1 Genetisches Modell der Karzinomentstehung (Knowles 1999a).

2.6. Theorien der Rezidiventstehung beim Harnblasenkarzinom

Von großer klinischer Bedeutung ist die gehäufte synchrone und metachrone Multilokalität mit hoher Rezidivfrequenz der oberflächlichen Harnblasenkarzinome.

Zur Rezidiventstehung existieren zwei Theorien:

In der ersten wird postuliert, daß durch den Einfluß von Karzinogenen die Zellen des gesamten Urothels genetische Alterationen anhäufen. Multifokale Tumoren können sekundär synchron oder metachron durch weitere maligne Transformation mehrerer Zellen entstehen (Harris and Neal 1992). Allgemein wird dies als „field change“ oder „field defect“ benannt. So konnten Paiss et al. bei 16 von 45 Tumoren eine polyklonale Entstehung nachweisen (Paiss et al. 2002).

Der in der Literatur überwiegend beschriebene zweite Entstehungsweg ist die monoklonale Entwicklung der multifokalen Tumoren aus einer maligne transformierten Vorläuferzelle. Dieser Primärtumor kann über intraluminale Zellausbreitung mit Zellimplantation an entferntem Urothel oder durch intraepitheliale Migration Absiedlungen setzen, was letztendlich zu einem multifokalem Tumorstadium führt. Diese Annahmen beruhen auf Untersuchungen an invasiven Urothelkarzinomen (Habuchi et al. 1993; Miyao et al. 1993). Takahashi et al. untersuchten mittels Mikrosatellitenanalyse die Klonalität von 87 Tumoren, davon 21 Rezidivtumoren, aus Harnblase, Ureter und Nierenbecken von 29 Patienten. In 16 Fällen stellten sich bei zum Teil multifokalen Primär- und dazugehörigen Rezidivtumoren übereinstimmende Alterationen im Sinne von Mikrosatellitenshift und/ oder LOH (Loss of heterozygosity) an den Chromosomen 9, 11p, 17p, 4, 2q und 8p dar. Bei weiteren 4 Patienten ergaben sich zum Teil differierende Alterationen, wobei aufgrund bestehender Veränderungen in den jeweiligen Tumoren (Shift, subchromosomale Deletionen, mehrere gleiche Alterationen) ebenfalls ein monoklonaler Ursprung der Tumoren anzunehmen ist. Bei 5 Patienten gab es keine sichere Übereinstimmung, bei weiteren 4 waren keine Läsionen nachweisbar.

Somit entwickeln sich mehr als 80 % der oberflächlichen multifokalen Tumoren aus einem Vorläufertumor (monoklonal). Bei den anderen Tumoren sind beide Varianten (field defect oder monoklonaler Entwicklungsweg) möglich (Takahashi et al. 1998), wobei Obermann et al. davon ausgehen, daß nach einer oligoklonalen Entstehung multilokulärer Harnblasenkarzinome im weiteren Verlauf der aggressivste Tumor die anderen Tumoren überwächst und somit einen monoklonalen Ursprung vortäuscht

(Obermann et al. 2003). Die Untersuchungen von Takahashi et al. wurden von Hartmann et al. bestätigt, welche bei 8 Patienten eine klonale Entwicklung multifokaler synchroner und metachroner oberflächlicher Blasentumoren nachweisen konnten (Hartmann et al. 2000).

Im weiteren Entwicklungsverlauf können die Subklone aufgrund genetischer Instabilität erneute unterschiedliche Chromosomenveränderungen entwickeln, wobei die aus dem Primärtumor erworbenen Veränderungen weitgehend nachgewiesen werden können (Sidransky et al. 1992; Takahashi et al. 1998; Hartmann et al. 2000). Weiterhin konnten Takahashi et al. bei 5 Patienten mit multilokulären oberflächlichen Tumoren mit diversen Chromosomenveränderungen eine genetische Stabilität der Rezidivtumoren über 3 Jahre ermitteln, was für eine stabile Tumorentität ohne stark erhöhtes Risiko für Tumorprogreß und Metastasierung spricht (Takahashi et al. 1998).

In Zusammenfassung der genannten Befunde kann man annehmen, daß die Mehrzahl der Tumorrezidive bzw. multilokulären Tumoren monoklonal entstehen. Eine Minorität entsteht wahrscheinlich aus dem „field defect“ (Hartmann et al. 2000). In diesem Fall dürften die synchronen oder metachronen Tumoren keine identischen genetischen Veränderungen haben, da sie sich in verschiedenen Urothelabschnitten unabhängig voneinander entwickeln. Anders ist dies bei den monoklonalen Rezidivtumoren, welche wie oben gezeigt ihrem Primärklon ähnliche genetische Veränderungen haben.

Bis jetzt existieren keine gesicherten Erkenntnisse darüber, welche genetischen Veränderungen Tumorzellen befähigen, durch Migration oder intraluminal Aussaat multifokales Wachstum zu erzeugen. Desweiteren ist nicht bekannt, inwieweit durch die transurethrale Resektion Tumorzellen verschleppt werden, welche zu Rezidivtumoren führen.

In der Literatur werden chromosomale Veränderungen beschrieben, die mit einer erhöhten Rezidivität oberflächlicher Tumoren in Zusammenhang gebracht werden: Monosomie 9 (Bartlett et al. 1998) sowie Aneusomie der Chromosomen 1, 7 und 17 (Watters et al. 2000; Pycha et al. 1997).

2.7. Diagnostik

2.7.1. Urinzytologie

Die Diagnostik des Harnblasenkarzinoms ist vor dem Hintergrund der häufigen Rezidiventstehung sehr kritisch zu hinterfragen. Sie sollte möglichst nichtinvasiv sein, eine hohe Spezifität und Sensitivität beinhalten sowie kostengünstig sein.

Die Urinzytologie kommt diesen Anforderungen am nächsten. Sie kann nichtinvasiv durchgeführt werden und hat eine hohe Spezifität (95 %) (Bastacky et al. 1999). Jedoch erreicht sie nur eine Sensitivität von 34-67 % (Schmetter et al. 1997; Nelde et al. 1998). Dabei können die schlecht differenzierten Tumoren und die zystoskopisch oft schwer diagnostizierbaren CIS bis zu 95 % detektiert werden. Demgegenüber ist bei über 50 % der gut differenzierten Harnblasentumoren kein pathologischer Urinbefund zu erheben (Bastacky et al. 1999; Rathert 2003).

Es werden zwar andere nichtinvasive Markersysteme (DNA-Zytometrie, Mehrparameterdurchflußzytometrie, tumorassoziierte Antigene, Telomerase, Uroplakine etc.) mit zum Teil guter Spezifität und Sensibilität erforscht, der klinische Einsatz ist jedoch aufgrund hoher Kosten, des hohen Aufwandes und einer geringen Reproduzierbarkeit noch nicht möglich (Übersichtsarbeiten (Kausch and Böhle 2003; Rathert 2003)).

2.7.2. Urethrozystoskopie

Die Problematik der geringen Sensitivität der Urinzytologie bei gut differenzierten Tumoren erklärt, warum auf die Urethrozystoskopie in der Tumordiagnostik nicht verzichtet werden kann. Die Kombination von Urethrozystoskopie (vor allem Diagnostik der gut differenzierten papillären Tumoren) mit der Urinzytologie (Diagnostik flacher schlecht differenzierter Läsionen) bilden zusammen den Goldstandard.

Die Zystoskopie ist ein invasiver Eingriff mit Komplikationsmöglichkeiten (Verletzungen, Harnröhrenstrikturen, Harnwegsinfekte) und Unkomfortabilität für den Patienten.

2.7.3. Photodynamische Diagnostik

In den letzten Jahren hat sich ein neues diagnostisches Verfahren, die photodynamische Diagnostik (PDD), etabliert. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Kombination aus konventioneller Zystoskopie und PDD eine signifikant höhere Sensitivität bei der Detektion maligner Veränderungen hat als die Zystoskopie allein (96,9 % vs. 72,7 %). Hervorstechend ist dabei die deutlich erhöhte Detektionsrate bei dysplastischen Veränderungen (95,8 % vs. 41,5 %). Allerdings können diese nicht sicher von ebenfalls fluoreszierenden entzündlichen Veränderungen abgegrenzt werden. Daher ist die Spezifität beider Verfahren gleich (66,6 % vs. 68,5 %) (Kriegmair et al. 1998). Besonders hoch ist der Wert der PDD bei der Diagnostik des CIS zu bewerten. In einer Studie von Zaak et al. konnten damit 52,8 % mehr CIS detektiert werden als im Weißlicht allein (Zaak et al. 2002). In Hinblick auf die hohe Progreßrate ist die Diagnose bedeutend, um schnell eine Therapieentscheidung (intravesikale Therapie, Zystektomie) treffen zu können.

Weiterhin kann durch die PDD im Vergleich zur Weißlichtresektion die Rate von Residualtumoren von 25,2 % auf 4,5 % gesenkt werden. In Folge dessen zeigte sich eine deutlich höhere rezidivfreie Überlebensrate (85 % versus 60,7 % in 48 Monaten). Diese Signifikanz ist auch bei pTa-Tumoren nachgewiesen (Filbeck et al. 2003).

2.7.4. Transurethrale Resektion

Die transurethrale Elektroresektion der Harnblase (Tu-TUR) hat eine diagnostische und therapeutische Funktion.

In der Diagnostik erfolgt die differenzierte Resektion der Tumoranteile, wobei getrennte Proben aus den Tumorrändern und aus dem Tumorgrund mit Muskulatur entnommen werden. Dies ist wichtig, da oftmals eine schlechtere Differenzierung am Tumorgrund vorliegt und der Tumor häufig von Dysplasie oder CIS umgeben ist. Bei oberflächlichen Tumoren erfolgt die Resektion radikal unter kurativen Gesichtspunkten. Erscheint ein Tumor muskelinvasiv, so wird meist nur eine tiefe diagnostische Resektion durchgeführt. Unter palliativen Gesichtspunkten kann eine

Planresektion des Tumors erfolgen. Weiterhin ist bei muskelinfiltrierenden Tumoren und Verdacht auf CIS eine Probe aus der prostatistischen Harnröhre zur Planung der weiteren Therapie empfehlenswert. Bei Verdacht auf ein CIS ist ggf. ein Mapping angezeigt, wobei die PDD-gestützte Zystoskopie wertvolle Hilfe leisten kann (Jocham 2003).

2.8. Therapie

Die Behandlung der Harnblasenkarzinome orientiert sich an Tumorstadium, Differenzierung, Rezidivrate, Metastasierung, Multifokalität und Nebenerkrankungen. Bei oberflächlichen Tumoren pTa/ pT1 ist die transurethrale Resektion das Verfahren der Wahl. Nach ca. 6 Wochen sollte eine Nachresektion erfolgen, wenn ein pT1-Stadium vorliegt. Bei schlecht differenzierten pT1-Tumoren fanden sich in 64 % Residualtumoren im Nachresektat und bei 24 % ein höheres Tumorstadium als der des Primärtumors (Brauers et al. 2001). Weiterhin sollten bei pTa-Tumoren Nachresektionen durchgeführt werden, wenn eine Resektion nicht sicher im Gesunden erfolgte oder eine schlechte Differenzierung vorliegt.

Andere operative Verfahren sind die Photodynamische Therapie und die Anwendung von Lasern zur Tumorzerstörung.

Eine weitere Therapieform ist die topische Anwendung von Chemotherapeutika und Immunmodulatoren zur Verhinderung eines Tumorrezidives. Dabei wird die Rezidivwahrscheinlichkeit der Tumoren nach transurethraler Resektion eingeschätzt. Entsprechende Faktoren sind das Tumorstadium, die Differenzierung und die Rezidivhäufigkeit. Während bei pTaG1-Tumoren eine Prophylaxe nur bei Rezidiven empfohlen wird, sind Instillationsbehandlungen bei allen Primär- und Rezidivtumoren pTaG2-3 und pT1G1-2 indiziert. Bei pT1G3-Tumoren kann ein Therapieversuch erfolgen, bei einem Rezidiv ist aber aufgrund der hohen Progesserate die Zystektomie notwendig. Die Frühinstillation wird bis zu 6h nach Resektion zur Verhinderung der intraluminalen Tumoransiedlung angewandt. Die Chemotherapie mit Mitomycin und Doxorubicin wird bei geringem Rezidivrisiko vorgezogen, bei hoher Rezidivgefahr (schlechte Differenzierung, frühere Rezidive, pT1G3) sollte BCG (Bacillus Calmette-Guérin) angewendet werden.

Ein Sonderfall ist das CIS. Bei diesem ist die Therapie mit BCG das Mittel der Wahl mit dem Ziel der Tumorzerstörung. Dabei konnten gute Remissionsraten erreicht werden. Bei einem Rezidiv ist zwischen nochmaliger lokaler Therapie und Zystektomie zu entscheiden.

Bei muskelinvasiven Tumoren ist die radikale Zystektomie mit Harnumleitung Mittel der Wahl. Diese kann auch unter palliativen Gesichtspunkten erfolgen. Bei Kontraindikationen oder Patientenwunsch ist auch eine Chemotherapie und/ oder Radiatio möglich. Ein lokal fortgeschrittenes Stadium (pT3-4) sowie eine Metastasierung machen den Einsatz einer adjuvanten Chemotherapie empfehlenswert.

(Nach den Leitlinien der Deutschen Urologischen Fachgesellschaft, AWMF)

3. Zielstellung

Typische Merkmale oberflächlicher Harnblasenkarzinome pTa ist deren geringe Progressionsbereitschaft sowie eine hohe Rezidivität. Zurzeit gibt es noch keinen verlässlichen Prognosemarker, der ein Rezidivrisiko dieser Tumoren anzeigt. Jedoch werden Chromosomenveränderungen beim Harnblasenkarzinom beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war es zu ermitteln, ob spezifische genetische Veränderungen nachgewiesen werden können, welche die Vorhersage eines erhöhten Rezidivrisikos erlauben.

Im Rahmen der Untersuchungen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Gibt es spezifische chromosomale Veränderungen rezidivierender Tumoren, welche sie von nichtrezidivierenden unterscheidet und ein spezielles Rezidivrisiko markieren?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen rezidivfreien Zeit rezidivierender Tumoren und typischen chromosomalen Veränderungen?
3. Unterscheiden sich monofokale von multifokalen Primärtumoren in ihren chromosomalen Aberrationen und kann daraus ein Rückschluß auf ein Rezidivrisiko geschlossen werden?
4. Gibt es spezielle chromosomale Veränderungen , welche mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren assoziiert sind?
5. Kann aus den Eigenschaften des Primärtumors wie Tumoranzahl, Größe oder Differenzierung ein Rückschluß auf sein weiteres Rezidivverhalten gezogen werden?
6. Gibt es geschlechtsspezifische Aberrationsmuster der untersuchten Tumoren?

Zur Beantwortung der Fragestellungen wurde die Vergleichende Genomische Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization, CGH) in Korrelation zu histopathologischen und klinischen Parametern eingesetzt.

4. Material und Methoden

4.1. Patienten und Untersuchungsmaterial

Es wurden 53 oberflächliche Harnblasentumoren pTaG1-2 untersucht.

25 der Patienten blieben tumorrezidivfrei, die rezidivfreien Intervalle lagen bei durchschnittlich 70 Monaten (33-110). 28 der Patienten hatten ein oder mehrere Tumorrezidive.

Die Patienten hatten zum Zeitpunkt der Tu-TUR ein durchschnittliches Alter von 65,6 Jahren (37-90). Davon waren 38 männlichen und 15 weiblichen Geschlechts.

Die Tumoren wurden in 35 Fällen als gut (G1) und in 18 Fällen als mittelgradig (G2) differenziert klassifiziert.

Die Patientendaten wurden retrospektiv erhoben. Die Resektionen der Tumoren einschließlich der Rezidivoperationen wurden im Zeitraum von 9/1987 bis 11/1998 in der Urologischen Klinik der FSU Jena durchgeführt. Das untersuchte Tumorgewebe wurde vom Pathologischen Institut der FSU Jena zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um in Paraffin eingebettete Tumoren, von denen histologische Schnittpräparate angefertigt wurden. Die histologische Klassifizierung wurde von den Pathologen noch einmal bestätigt und die Regionen mit sicherem Tumormaterial gekennzeichnet. Das Tumormaterial ist daraufhin von den Objektträgern mechanisch entfernt und zur DNA-Aufbereitung verwendet worden.

Bei zwei Patienten entwickelten sich die pTa-Rezidive aus einem pT1G2- und bei einem weiteren aus einem pT1G3-Blasentumor. Ein Patient entwickelte im Verlauf einen Nierenbecken- und Uretertumor vom Stadium pT1G3. Die bei ihm erhobenen CGH-Ergebnisse flossen nur in den Vergleich rezidivierender und nicht-rezidivierender Tumoren sowie in die Differenzierungs- und Geschlechtervergleiche ein. Dieser Patient wurde aus der Analyse des Vergleiches der Multifokalität und rezidivfreien Zeit hinsichtlich chromosomaler Veränderungen sowie des klinischen Verhaltens ausgeschlossen, da in Folge des Tumors der oberen Harnwege das biologische Verhalten des Primärtumors hinsichtlich Multifokalität und Rezidivfreiheit nicht unmittelbar vergleichbar war.

Die CGH konnte bei jeweils 10 Primärtumoren aus beiden Rezidivgruppen (monofokal/ multifokal) durchgeführt werden. Desweiteren wurden entsprechend 3

bzw. 4 Rezidivtumoren ausgewertet (nicht genug Tumormaterial der Ersttumore zur Verfügung bzw. primär minimalinvasives Karzinom pT1).

4.2. Methoden

4.2.1. Einführung in die CGH

Mittels der CGH (Comparative Genomic Hybridization, Vergleichende Genomische Hybridisierung) ist es möglich, chromosomale Zugewinne und Verluste über das gesamte Genom nachzuweisen. Um genug DNA zur Verfügung zu haben, erfolgt die DOP-PCR (Polymerasekettenreaktion mittels degenerierter Oligonukleotidprimer) zur Amplifizierung.

Das Prinzip der PCR besteht in der Anfertigung einer komplementären Kopie eines DNA-Einzelstranges durch eine DNA-Polymerase mittels Oligonukleotiden als Primer und den 4 Nukleotiden. Im ersten Schritt werden die DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen denaturiert durch Erhitzen auf ca. 94°C, da sich bei dieser Temperatur die Bindungen der sich gegenüberliegenden Nukleotide lösen. Im zweiten Schritt erfolgt nach Abkühlen die Bindung von Primern an komplementäre Stellen der Einzelstrang-DNA. Im dritten Schritt wird durch eine optimale Temperatur die DNA-Polymerase aktiviert, die vom 3'-Ende des Primers durch Einbau der 4 Nukleotide eine komplementäre Kopie des Originalstranges synthetisiert. Anschließend erfolgt erneut durch Erhitzen auf über 94°C die Denaturierung der Stränge, nach Abkühlung das Anlagern der Primer und nach Temperaturoptimierung die Synthese eines neuen Stranges. Diese Abfolge wird 20-35 mal wiederholt (Brown 1996).

Die DOP-PCR benutzt degenerierte Oligonukleotid-Primer. Diese Primer bestehen aus 3 Teilen. Das 3'-Ende hat 6 Basen, die den Primer hochspezifisch für dieses Ende machen und relativ häufig im Genom vorkommen. Der Mittelteil besteht aus 6 sogenannten degenerierten Nukleotiden mit wechselnder Sequenz. Das 5'-Ende besteht aus einer Sequenz, welche ein spezifischer Angriffsort eines Restriktionsenzym ist und im Genom selten vorkommt.

In den ersten 8 Polymeraseschritten kommt es aufgrund einer niedrigen Temperatur von 30°C zu einer relativ unspezifischen Anlagerung des teilweise degenerierten

3'-Ende an die DNA und Amplifikation bei 37°C, desweiteren werden die nun erhaltenen Einzelstränge ebenfalls durch DOP-Primer in entgegengesetzter Richtung komplementär kopiert. Auf diese Weise entstehen Einzelfragmente von ca. 200-1000 bp mit dem DOP-Primer an dem 5'-Ende und der dazu komplementären Kopie am 3'-Ende .

Die Amplifikationen der darauffolgenden Schritte werden bei höheren Temperaturen durchgeführt (56°C bzw. 72°C). Dadurch müssen sich die DOP-Primer mit ihren gesamten 3'-Abschnitten an ihre Kopien an den Enden der Einzelstränge heften, um als Initiatoren für weitere Amplifikationen fungieren zu können. Die Festigkeit der Bindung wird durch die zwei äußeren Teile des Primers bestimmt, der degenerierte Mittelteil stört die Festigkeit der Bindung nicht. In den darauffolgenden 32 PCR-Zyklen werden also nur noch spezifisch die Einzelstränge amplifiziert. Dabei wird bei jedem Zyklus theoretisch die DNA verdoppelt, was aber durch gewisse Reaktionsbedingungen limitiert wird (Telenius et al. 1992).

Die DOP-PCR ist eine hocheffektive Methode, um aus einer geringen Ausgangsmenge genügend DNA für die CGH bereitzustellen. Die hergestellten DNA-Stränge mit einer Länge von ca. 200-1000 bp sind optimal für die CGH.

Die PCR ist eine sehr empfindliche Reaktion, sie kann von vielen Faktoren gestört werden. Der wichtigste Störfaktor ist die Kontamination mit fremder DNA oder Plasmiden. Das Risiko steigt dabei stark an bei wenig Ausgangsmaterial oder vielen Amplifikationszyklen. Deshalb sind bestimmte Arbeitsbedingungen notwendig, wie die Verwendung von sterilen Materialien, Handschuhen, klein portioniertem Probenmaterial, die räumliche Trennung der PCR von den Amplifikationsprodukten und die Benutzung von Reinräumen, UV-Licht oder Reinigung mit DNase-haltigen Reinigungsmitteln. Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, ist unbedingt eine Negativkontrolle, also eine PCR ohne DNA, bei jedem Versuchsdurchgang mit durchzuführen. Falsch negative Ergebnisse können technisch bedingt sein, weshalb eine Positivkontrolle mit bekannter DNA in jedem Versuchszyklus anzuraten ist. Ursachen können falsche Temperaturen, zu kurze Zyklen, falsche Mg-Konzentrationen oder auch Hämoglobinkontaminationen sein. Bei der Verwendung zu hoher Primermengen kann es zu einer Selbstamplifikation der Primer kommen, was ebenfalls ein falsch positives Ergebnis vortäuschen würde. Da die Taq-Polymerase keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität zur Fehlerbehebung während der Replikation hat, kann es alle 10^5 Basenpaare zu Replikationsfehlern kommen. Diese Fehler sind vor

allem bei sehr geringen Ausgangs-DNA-Mengen von Bedeutung, wie z.B. Single-Cell-Detektion (Linz and Degenhardt 1990; Kumar 1989; Wright and Wynford-Thomas 1990; Brown 1996). Bei unseren Untersuchungen wurden aus den Paraffinschnitten vergleichsweise große Mengen an DNA gewonnen, so daß diese Fehlerrate bei der Amplifikation weniger ins Gewicht fiel.

Um das relative Verhältnis von Tumor- und Normal-DNA während der CGH zu vergleichen, erfolgte die Markierung der DNA (Labeling). Dabei wurden als indirekte Markierung über mehrere PCR-Zyklen Nukleotide mit Markermolekülen in die DNA-Stränge eingefügt, Biotin-16-dUTP in Tumor-DNA und Digoxigenin-11-dUTP in Normal-DNA. Diese Markermoleküle binden fluorchromtragende Moleküle (Leitch et al. 1994).

Für die CGH wurden jeweils gleiche definierte Mengen denaturierte, vorher in der DOP-PCR amplifizierte und markierte Tumor- und Normal-DNA auf einen Objektträger gegeben, auf dem sich ebenfalls zu Einzelsträngen denaturierte Metaphasen gesunder Lymphozyten befanden. Während einer Inkubationszeit von 2-4 Tagen binden die entsprechenden DNA-Fragmente an die komplementären Stellen der Metaphase. Wenn für eine bestimmte Chromosomenregion gleich viel Tumor- wie auch Normal-DNA vorhanden war, lagerten sich die Fragmente im Verhältnis 1:1 an. Wenn durch Verluste im Verhältnis weniger Tumor- als Normal-DNA vorhanden war, lagerte sich im selben Verhältnis dazu entsprechend mehr Normal-DNA als Tumor-DNA an. Umgekehrt lagerte sich bei Zugewinn von Tumor-DNA diese im entsprechenden Verhältnis an den entsprechenden Chromosomenregionen auf der Metaphase an.

Anschließend erfolgte die Markierung. Die Normal-DNA wurde an den Digoxigenin-markierten Nukleotiden mit rotfluoreszierendem Anti-Digoxigenin-Rhodamin markiert. Entsprechend wurde die Tumor-DNA mittels grünfluoreszierendem Avidin-FITC (Fluoreszeinisothiozyanat) markiert, wobei dieses kovalent an Biotin bindet. Die Chromosomen wurden mit 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) als Gegenfärbung behandelt, wodurch das spezifische Bandenmuster sichtbar wurde. Die Metaphasen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgesucht, mit Hilfe einer CCD-Kamera (charge coupled device) aufgenommen und mit dem Farbfluoreszenzbildbearbeitungssystem ISIS® (In situ imaging system®) am Rechner weiterbearbeitet.

Zuerst wurden die Chromosomen entsprechend ihrer Bandenfärbung in ein Karyogramm einsortiert. Nachdem das Zentromer für jedes Chromosom definiert wurde, erfolgte der Vergleich der Intensität der grünen mit der roten Fluoreszenz entlang der einzelnen Chromosomen. Über- bzw. unterschritt die Fluoreszenzratio (im weiteren FR genannt) einen bestimmten Schwellenwert (1,25 bzw. 0,75), so wurde das als eine relative Über- bzw. Unterrepräsentation von Tumor- im Vergleich zu Normal-DNA in dieser Chromosomenregion gesehen, also Zugewinn bzw. Verlust. Es wurden mindestens jeweils 15 Metaphaseplatten pro Tumor ausgewertet und die FR für jedes Chromosom gemittelt. Die so gewonnenen Chromosomenveränderungen stellen spezifische Veränderungen im Tumor dar, welche mögliche Orte von Tumorsuppressorgenen (Verluste) oder Onkogenen (Amplifikationen/ Gewinne) sein können. In der CGH können chromosomale Veränderungen mit einer Größe ab minimal 10 Mbp erkannt werden.

Mit der CGH kann man das gesamte Genom auf genetische Veränderungen hin untersuchen. In Verbindung mit der PCR sind geringe Mengen Ausgangs-DNA ausreichend. Es können unterschiedliche Tumormaterialien analysiert werden, unter anderem Frischpräparate, Gefrierschnitte, Paraffinschnitte und Einzelzellen.

Man vermeidet die bei z.B. Karyotypisierung mögliche Zellklonselektion nach Kultivierung, wodurch falsche Ergebnisse provoziert werden können. Kleine Subklone im Tumor stören nicht das Gesamtbild.

Nachteile der Methode liegen in folgenden Beziehungen:

Es ist mit der CGH nur möglich, unbalanzierte Aberrationen zu entdecken. Nicht möglich ist die Detektion von strukturellen balanzierten Aberrationen wie Translokationen, Bildung von Isochromosomen, Ringchromosomen oder Inversionen. Somit entgehen mögliche Rearrangements von Genmaterial der Untersuchung. Kleine Aberrationen unter 10 Mbp sind nicht detektierbar. Es wird das gesamte genetische Material aller Zellen untersucht. Veränderungen kleiner Subklone kann man nicht entdecken, es sei denn, man senkt die Schwellenwerte auf Kosten der Spezifität ab. Wenn Tumoren sehr heterogen sind, werden viele Aberrationen nicht erfaßt, so daß auch größere Subklone mit einem Zellanteil von 10-20 % unentdeckt bleiben können. Zuviel Normalgewebe und Lymphozyten können die Ergebnisse stören.

4.2.2. DNA-Isolation

Die DNA der Tumoren wurde nach Kennzeichnung der tumortragenden Anteile auf dem Objektträger durch den Pathologen folgendermaßen isoliert: Nach Ablösen der Deckgläser von den Objektträgern wurden die gekennzeichneten Areale auf den Schnitten mit einer Lanzette abgetragen. Anschließend erfolgte das Herauslösen des Paraffins durch je 2-maliges Behandeln mit Xylol bzw. folgend Äthanol. Zur DNA-Isolation wurde ein kommerzielles Kit der Firma Qiagen® (QIAmp Tissue KIT®) verwendet. Das Gewebe wurde in ein Reaktionsgefäß in 180 µl ATL-Puffer gegeben, mit 20 µl Proteinase K versetzt und bei 55°C für 2h inkubiert, dadurch wurde das Zytoplasma aufgelöst. Folgend wurden 200 µl AL-Puffer zugegeben, gründlich geschüttelt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 210 µl Äthanol wurde die Mixtur in ein QIAmp-Filterröhrchen gegeben, welches in einem 2 ml Sammelröhrchen steht. Es erfolgte eine Zentrifugation über 2 min bei 6000⁻¹. Das Filterröhrchen wurde in ein neues Sammelröhrchen gestellt (altes Röhrchen und Filtrat verworfen), 500 µl AW-Puffer zugesetzt und bei 6000⁻¹ 2 min zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde wiederholt, anschließend folgte eine Zentrifugation über 1 min bei 14000⁻¹. Das Sammelröhrchen wurde gewechselt, anschließend zwei Mal 100 µl AE-Puffer eingefüllt bei 70°C für 5 min, nach Abkühlung auf Raumtemperatur 1 min inkubiert, dazwischen und nachfolgend wurde eine Zentrifugation bei 6000⁻¹ für 2 min durchgeführt. Das Filtrat enthielt die DNA, deren Konzentration mit dem Photospektrometer Gene Quant II von Pharmacia Biotech® gemessen wurde. Die Normal-DNA der Lymphozyten von gesunden Probanden wurde mit dem gleichen Protokoll gewonnen.

4.2.3. DNA-Amplifikation

Für die Vervielfältigung der DNA in der DOP-PCR wurde die DNA so mit H₂O verdünnt, daß 0,1-1 µg DNA in 0,5-2 µl enthalten waren. Die DNA-Amplifikation wurde im Thermocycler PTC-100 mit beheiztem Deckel durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die DNA mittels der Sequenase in 8 Zyklen so vervielfältigt, daß DNA-Stücke von 200-1000 bp Länge entstanden. In den darauffolgenden 32 Zyklen wurden diese DNA-Stücke mit Hilfe der Ampli-Taq vervielfältigt.

Es werden 4 Lösungen benötigt:.

-Lösung A mit 5 µl pro Ansatz (Tab. 1):

Tab. 1 Lösung A

	Ansatz
H ₂ O	in H ₂ O
Sequenase Puffer	0,6x
DOP-Primer	5 µM
dNTPs	200 µM

-Lösung B mit 0,3-0,4 Units Sequenase in 0,24 µl Sequenase Dilution Puffer für jeden der 8 Zyklen

-Lösung C mit 45 µl pro Ansatz (Tab. 2):

Tab. 2 Lösung C

	Ansatz
H ₂ O	in H ₂ O
Stoffel-Puffer	1x
dNTPs	220 µM
DOP-Primer	1,1 µM
MgCl ₂	2,5 mM

-Lösung D mit 5 µl pro Ansatz (Tab. 3):

Tab. 3 Lösung D

	Ansatz
H ₂ O	in H ₂ O
Stoffel Fragment Taq.-Polymerase Puffer	1x
MgCl ₂	2,5 mM
Taq.-Polymerase (StoffelFragment)	1 U/µl

Die PCR wurde in folgenden Schritten durchgeführt, welche in den Thermocycler einprogrammiert waren:

0,5-2 µl DNA-Lösung (mit 0,1-1 ng DNA) und 5 µl Lösung A

- a) 96°C 5 min
- b) 30°C Einfüllen von 0,24 µl Lösung B, 2 min 20 s
- c) 37°C 2 min
- d) 95°C 1 min
- e) Wiederholen der Schritte b-d 7-mal
- f) 30°C Einfüllen von 45 µl Lösung C, 2 min 20 s
- g) 95°C 1 min
- h) 56°C Einfüllen von 5 µl Lösung D, 2 min 20 s
- i) 72°C 1 min
- j) 94°C 1 min
- k) 56°C 1 min
- l) 72°C 2 min
- m) Schritte j-l wiederholen sich 31-mal.
- n) 72°C 10 min
- o) 4°C Endtemperatur

Nach erfolgter PCR wurde auf einem 2%-igem Agarosegel mit jeweils 5 µl Probe, 4 µl Load-Mix und 5 µl TBE-Puffer eine Elektrophorese durchgeführt. Zusätzlich ließ man zum Vergleich 1 µl Standard (Boehringer VIII®) mit 4 µl Load-mix und 9 µl TBE-Puffer mitlaufen. Nach der Elektrophorese unter 150 V und 150 mA für 20 min und einem 15-minütigen Ethidiumbromidbad kontrollierte man unter UV-Licht die Größen der DNA-Fragmente, sie sollten zwischen 200 und 1000 bp liegen. Die Normal-DNA wurde in gleicher Weise wie oben beschrieben amplifiziert und gemessen. Die DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

4.2.4. DNA-Markierung

Zum Markieren der DNA wurden pro Ansatz 5 µl von dem jeweiligen Probevolumen aus der DNA-Amplifikation und 45 µl aus folgender Lösung in die Reaktionsgefäße gegeben (Tab. 4):

Tab. 4 Lösung zur DNA-Markierung

	Ansatz
H ₂ O	in H ₂ O
Replitherm Puffer RP	1x
dNTP`s	1x
Biotin-16- bzw. Dig-11-dUTP	100 µM
DOP-Primer	2 µM
MgCl ₂	2,5 mM
Ampli-Taq	0,03 U/µl

In dem Thermocycler lief anschließend folgendes Programm:

- 1) 95°C 3 min
- 2) 94°C 1 min
- 3) 56°C 1 min
- 4) 72°C 2 min
- 5) 72°C 5 min
- 6) 4°C Endtemperatur

Die Schritte 2-4 wurden 20-mal wiederholt.

Die DNA wurde nun von den verbliebenen Nukleotiden und Primern gereinigt. Dazu wurden G-50 Sephadex-Säulen bei 2600⁻¹ für 2 min abzentrifugiert, anschließend die Lösungen aus der PCR eingefüllt und bei 2600⁻¹ zentrifugiert. Nun wurde der DNA-Gehalt der gewonnenen Lösungen mittels Extinktionsmessung ermittelt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

4.2.5. Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden je 1 µg Tumor- und Normal-DNA verwendet. Diese wurden mit 70 µg Cot-1-DNA (zum Besetzen hochrepetetiver störender Sequenzen in Zentromerregionen, p-Armen akrozentrischer Chromosomen und heterochromatischen Regionen), 100 % Ethanol (2/3 der Gesamtlösung) sowie 1-molarer Natriumazetatlösung (1/20 der Gesamtlösung, zum Ausfällen der DNA) für 30 min bei -70°C gelagert. Dann wurden die Reaktionsgefäße 10 min bei 14000⁻¹ zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, nach Zugabe von 500 µl 70 %-igen Ethanol

wiederum 10 min mit 14000^{-1} zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die DNA in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde dann bei 37°C in 15 µl Hybridisol VII (Oncor®) für 30 min gelöst, danach bei 70°C im Wasserbad 5 min denaturiert, für 5 min auf -20°C abgekühlt und für 30 min bei 37°C vorinkubiert.

Es wurden Objektträger mit darauf fixierten Metaphasen von gezüchteten Lymphozyten gesunder Menschen verwendet. Für die Behandlung der Objektträger benötigte man folgende Lösungen:

- 20xSSC (in 1000 ml H₂O 88,4 g Natriumzitat und 175,4 g Natriumchlorid lösen, pH 7,0 mit HCl einstellen, Autoklavieren) und

- Formamid 70 % (70 ml Formamid, 10 ml 20xSSC, 20 ml H₂O, pH 7,0 mit HCl einstellen).

Zuerst wurden die Objektträger unter dem Lichtmikroskop bezüglich der Anzahl und Qualität der vorhandenen Metaphasen begutachtet. Die Objektträger wurden dann für 2 min in 70% Formamid bei 70°C gegeben, wobei die Lymphozyten-DNA zu Einzelsträngen denaturiert wurde. Die Dehydrierung erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (je 2 min 70 % Ethanol (-20°C), 85 % und 100 % Ethanol).

Die Objektträger wurden luftgetrocknet. Die vorhybridisierte DNA wurde nun auf eine Hälfte eines Objektträgers gegeben und mit einem Deckgläschen zugedeckt. Das Deckglas wurde mit Fixogum-Laborkleber verschlossen, die Hybridisierung erfolgte für 2-4 Tage bei 37°C in einer feuchten Kammer.

4.2.6. Detektion

Für die Detektion benötigte man folgende Lösungen:

50% Formamid (250 ml Formamid und 50 ml 20x SSC mischen und mit HCl pH auf 7,0 einstellen, anschließend mit Aqua auf 500 ml auffüllen), 2x SSC (50 ml 20x SSC mit H₂O auf 500 ml auffüllen), 0,1x SSC (25 ml 2x SSC mit H₂O auf 500 ml auffüllen), 4x SSC/ Tween (100 ml 20x SSC und 1 ml Tween mischen und mit HCl auf pH 7,0 einstellen, mit H₂O auf 500 ml auffüllen) sowie 5% BSA in 4x SSC (0,5 g BSA in 10 ml 4x SSC/ Tween lösen, im Kühlschrank lagern).

Die Objektträger wurden nach Entfernung des Deckgläschens 2-mal 10 min in 50% Formamid bei 42°C, anschließend 2-mal 10 min in 0,1x SSC bei 60°C und 2 min in 4x SSC/ Tween gewaschen. Dann wurden 100 µl 5% BSA in 4x SSC auf den

Objektträger gegeben, mit Folie abgedeckt und für 20 min bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. In 500 µl 5% BSA in 4x SSC wurden 1 µl Avidin-FITC gelöst, wobei pro Objektträger 100 µl verwendet wurden, 50 µl Anti-Digoxigenin-Rhodamin (verdünnt 1:10) pro 200 µl zugegeben und auf den Objektträger aufgetragen, mit Folie belegt und bei 37°C 30 min inkubiert. Zum Schluß wurde der Objektträger 2-mal 5 min in 4x SSC-Tween gewaschen und 20 µl DAPI/ Antifade (Oncor®) aufgetragen sowie mit einem Deckglas versehen.

4.2.7. Auswertung

Die Metaphasen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss®) aufgenommen (Abb. 2). Die Chromosomen wurden mit Hilfe des ISIS-Programms (In situ imaging system®, Metasystems) anhand des Bandenmusters in Karyogramme sortiert und das Zentromer definiert (Abb 3). Das war die Grundlage der Berechnung des Fluoreszenzprofils der aufgenommenen Chromosomen, welches sich aus der Rot/ Grün-Ratio ergab. Die Mittelung über alle Chromosomen eines Tumors ergibt ein für den Fall spezifisches Summenprofil, bei dem ein relatives Überwiegen (ab 1,25) Zugewinne (roter Balken) und Unterrepräsentation (kleiner 0,75) Verluste (grüner Balken) in dieser Chromosomenregion bedeuten (Abb 4).

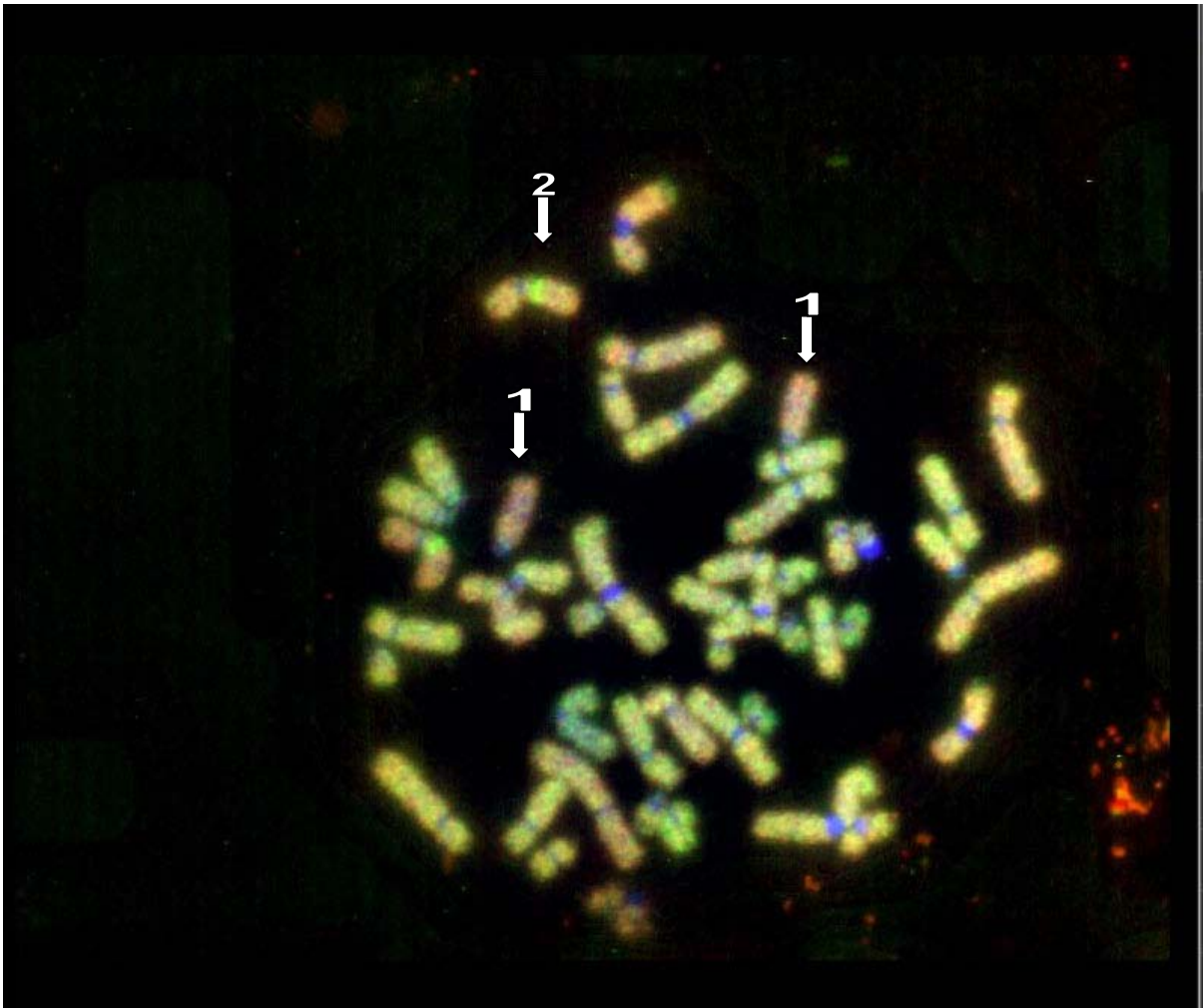


Abb. 2: Metaphasenplatte bei Detektion

Metaphase des Tumors 20: Schon durch die Mikroskopie lassen sich bestimmte Veränderungen der Tumor-DNA (grün markiert) im Verhältnis zur Normal-DNA (rot markiert) nachweisen, welche sich während der Hybridisierung an die Metaphase komplementär angelagert haben. So ist das Chromosom 13 von Verlust betroffen, relatives Überwiegen der Normal-DNA imponiert als Rotfärbung (Pfeil 1). Im Gegensatz leuchtet auf 11q eine grüne Bande auf, diese entsteht durch Amplifikation der Tumor-DNA in diesem Bereich (Pfeil 2).

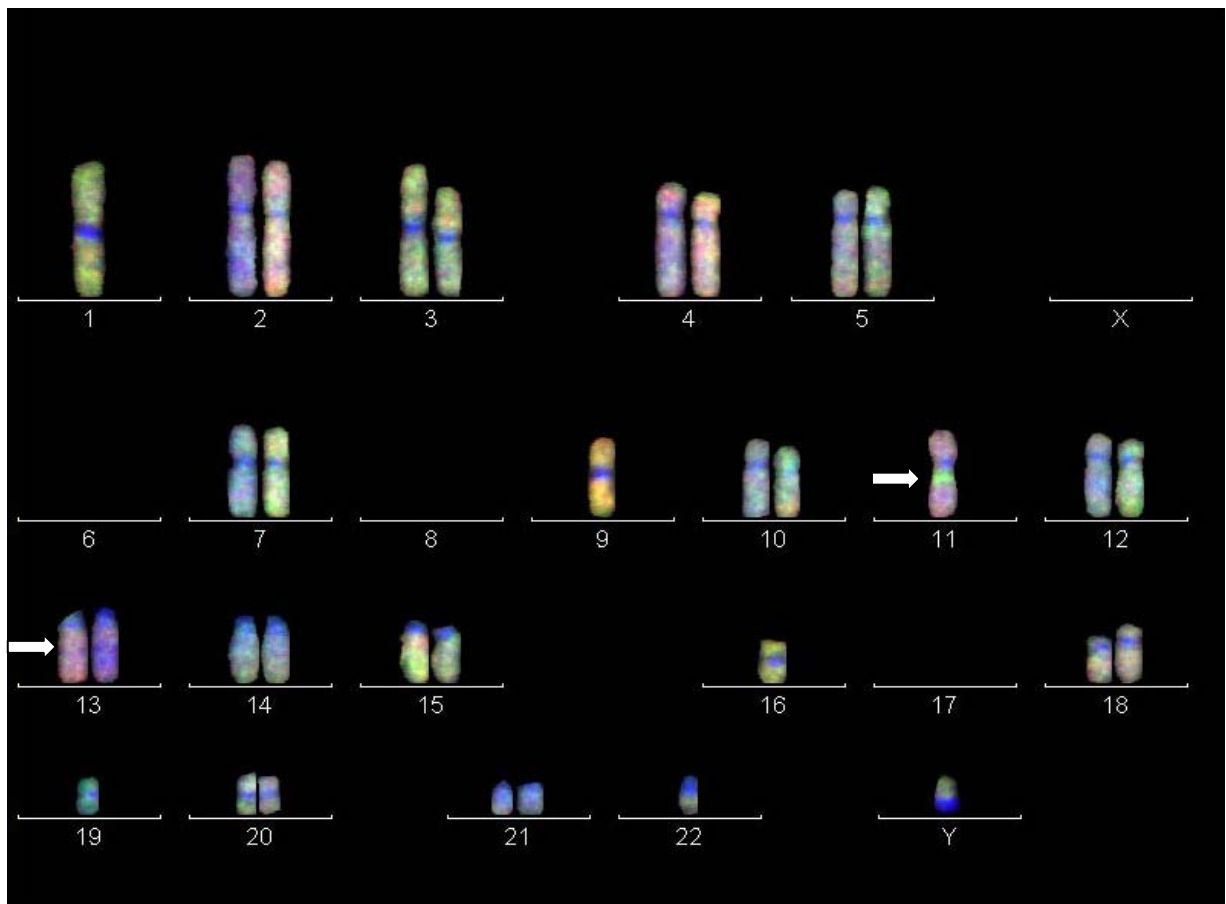


Abb. 3: Einordnen der Chromosomen in ein Karyogramm

Die Chromosomen der Metaphasen werden in ein Karyogramm sortiert und die Zentromerregionen zur Abgrenzung der p- und q-Arme definiert. Die in Abb. 2 gezeigten Veränderungen sind hier auch dargestellt, die Chromosomen 13 sind durch Verlust beim Tumor mehr rotgefärbt, während auf dem Chromosom 11 eine leuchtende grüne Bande am langen Arm eine Amplifikation anzeigt.

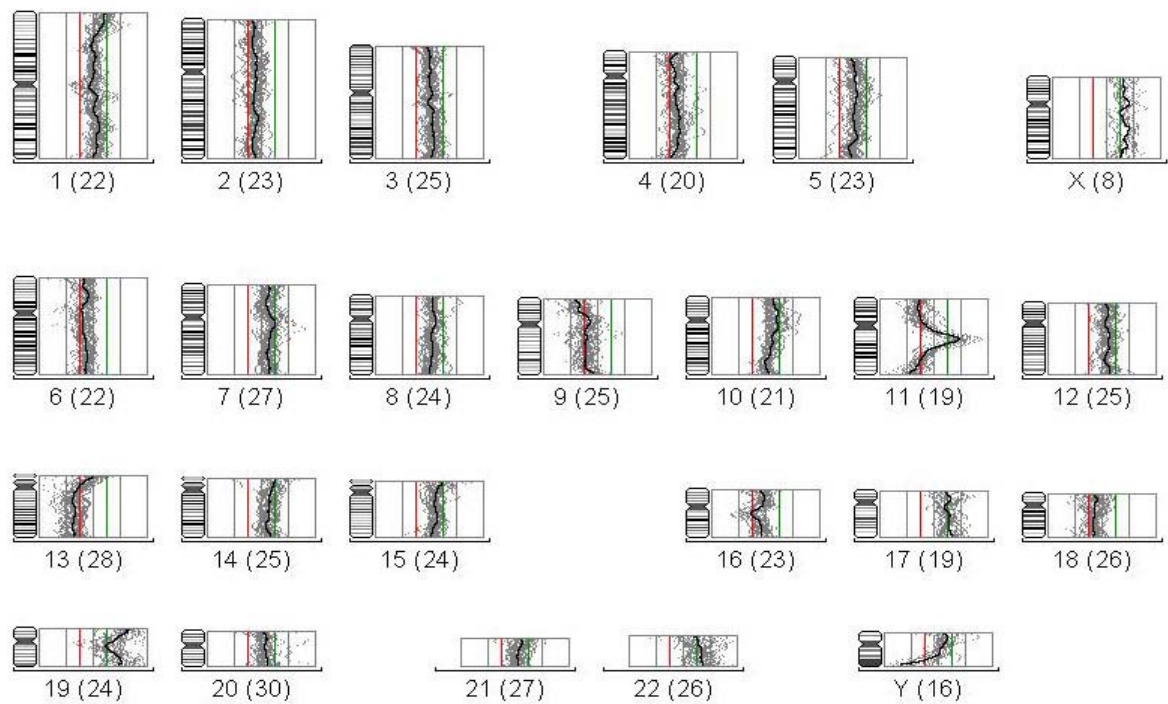


Abb. 4: Karyogramm mit Einzel- und Summenprofil der Fluoreszenzratio

Die Abbildung zeigt die Einzel- und Summenprofile der Rot-Grün-Fluoreszenz der einzelnen Chromosomen des Tumors 20. Verlust bzw. Gewinn von Tumor-DNA wird bei Unter- bzw. Überschreitung eines Grenzwertes (0,75 bzw. 1,25) definiert. In diesem Falle zeigt sich ein Verlust (roter Balken) von 9pterq33 sowie Chromosom 13, ein Gewinn (grüner Balken) von Chromosom 17 und ein Verlust von 11p11q14qter mit Amplifikation von 11q13.

5. Ergebnisse

5.1. Allgemeine Ergebnisse

Es wurden 53 oberflächliche Blasentumoren des Stadiums pTaG1-2 untersucht.

Die Patienten hatten zum Zeitpunkt der Tu-TUR ein durchschnittliches Alter von 65,6 Jahren (37-90). Davon waren 38 männlichen und 15 weiblichen Geschlechts.

Von den Tumoren wurden 35 als gut (G1) und 18 als mittelgradig (G2) differenziert klassifiziert. 25 Patienten blieben tumorrezidivfrei, wobei die Nachbeobachtungszeiten bei durchschnittlich 70 Monaten (33-110) lagen. 28 Patienten hatten ein oder mehrere Tumorrezidive im Beobachtungszeitraum, dabei betrug die durchschnittliche rezidivfreie Zeit 16 Monate (2-84 Monate) bei ein bis mehr als 20 Rezidiven.

Für den Vergleich der Tumoren hinsichtlich einer Multilokalität der Primärtumoren und der Rezidivität wurden die Patienten in 4 Gruppen eingeteilt:

NRBT1 - 17 Patienten mit unifokalem Tumor ohne Rezidiv,

RBT1 - 13 Patienten mit unifokalem Tumor mit Rezidiv,

NRBTm - 8 Patienten mit multifokalen Tumoren ohne Rezidiv und

RBTm - 14 Patienten mit multifokalen Tumoren mit Rezidiv.

Patienten mit rezidivierenden Tumoren und singulärem Tumor als Erstbefund wurden der Gruppe RBT1 und solche mit multiplen Tumoren als Erstbefund der Gruppe RBTm zugeordnet.

Beim Vergleich der Rezidivität der Gruppen entwickelten 43 % der ursprünglich monofokalen und 64 % der multifokalen Tumoren Rezidive. Daraus ergab sich eine tendenzielle Zunahme der Rezidivität bei multifokalem Tumorwachstum.

Die durchschnittlichen Tumorgrößen der Primärbefunde (bei multiplen Tumoren größter beschriebener Tumor) lagen bei 19 mm (NRBT1), 20mm (RBT1) sowie 35mm (NRBTm und RBTm).

Unifokale rezidivierende Tumoren entwickelten im Schnitt 2,4 (1-6) und multifokale Tumoren 2,6 (1-9) Rezidive im Beobachtungszeitraum (Zeitspanne: Auftreten Primärtumor bis letztes Rezidiv). Dabei wurde ein Patient der Gruppe RBTm mit mehr als 20 Rezidiven nicht einberechnet.

RBT1 entwickelten im Schnitt aller 17,5 Monate und RBTm aller 10,2 Monate ein Rezidiv. Deutlich zeigte sich die verkürzte rezidivfreie Zeit bei den multiplen Tumoren.

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit sich Tumoren mit hoher Rezidivfrequenz in ihrem klinischen Verhalten von Tumoren mit geringerer Rezidivneigung unterscheiden. Dazu wurden 27 Patienten mit rezidivierenden Tumoren in 4 Gruppen unterteilt mit einer durchschnittlichen rezidivfreien Zeit von bis zu 6 Monaten (9 Patienten), 7-12 Monaten (6 Patienten), 13-24 Monaten (7 Patienten) und mehr als 24 Monaten (5 Patienten). Patienten mit primär mikroinvasiven Tumoren (pT1) fanden sich nur in der Gruppe mit einer rezidivfreien Zeit von bis zu 6 Monaten.

Die durchschnittliche Rezidivzahl nahm mit zunehmendem Rezidivintervall deutlich ab: Tumoren mit einer durchschnittlichen rezidivfreien Zeit von bis zu 6 Monaten hatten 8,2 Rezidive, 7-12 Monaten 3,2 Rezidive, 13-24 Monaten 2,3 Rezidive und mehr als 24 Monaten 1,4 Rezidive.

Tumoren mit kurzem Rezidivintervall hatten häufiger multiple Primärtumoren als jene mit langem Rezidivintervall: bei einer Rezidivzeit von bis zu 6 Monaten zu 33 % durchschnittlich 3 Tumoren und zu 67 % 5 und mehr Tumoren, bei 7-12 Monaten zu 83 % 1 Tumor und zu 17 % 5 und mehr Tumoren, bei 13-24 Monaten zu 71 % 1,8 Tumoren und zu 29 % 5 und mehr Tumoren und bei mehr als 24 Monaten zu 100 % 1,2 Tumoren.

Die durchschnittliche Tumorgroße der Primärtumoren war bei Patienten, welche schneller Rezidive erlitten, tendenziell größer. Sie betrug bei einer Rezidivzeit von bis zu 6 Monaten durchschnittlich 30 mm, bei 7-12 Monaten 16 mm, bei 13-24 Monaten 26 mm und mehr als 24 Monaten 22 mm (Tab. 5).

Tab. 5 Durchschnittliche Rezidivzahl im Beobachtungszeitraum, Anzahl der Primärtumoren sowie durchschnittliche Größe des (größten) Primärtumors in Abhängigkeit von der durchschnittlichen rezidivfreien Zeit

durchschnittliche rezidivfreie Zeit	bis 6 Monate (9 Patienten)	7-12 Monate (6 Patienten)	13-24 Monate (7 Patienten)	>24 Monate (5 Patienten)
durchschnittliche Rezidivzahl	8,2	3,2	2,3	1,4
prozentuale Verteilung hinsichtlich der Anzahl der Primärtumoren	bei 33% 3 Tumoren bei 67% ≥5 Tumoren	bei 83% 1 Tumor bei 17% ≥5 Tumoren	bei 71% ca. 1,8 Tumoren bei 29% ≥5 Tumore	bei 100% ca. 1,2 Tumore
durchschnittliche Primärtumorgroße	30mm	16mm	26mm	22mm

5.2. Chromosomale Veränderungen der pTa-Tumoren

Bei der Auswertung der CGH-Befunde wurden die Chromosomen 19 und 22 von der Analyse generell ausgeschlossen, um keine falsch positiven Ergebnisse durch deren hohe Polymorphie zu erhalten. Ebenfalls ausgeschlossen wurde Chromosom X wegen möglicher falsch positiver Signale in der CGH (eigene Ergebnisse). Aufgrund der Heterogenität im Tumor wurde ein generelles Cut off von 10 % gewählt. Die Aberrationen an den Y-Chromosomen wurden prozentual nur auf die männlichen Patienten bezogen.

Die Gesamtaberrationszahl aller untersuchten Harnblasenkarzinome betrug 141, somit pro Tumor 2,66 (0-10). Gewinne fanden sich bei 52 (0,98 (0-8) pro Tumor) und Verluste bei 89 (1,68 (0-7) pro Tumor) Chromosomen. Das Verhältnis Verlust zu Gewinn betrug 63 % zu 37 %. 9 Tumoren zeigten keine Aberrationen.

In Abbildung 5 sind die Chromosomenaberrationen der pTa-Tumore dargestellt.

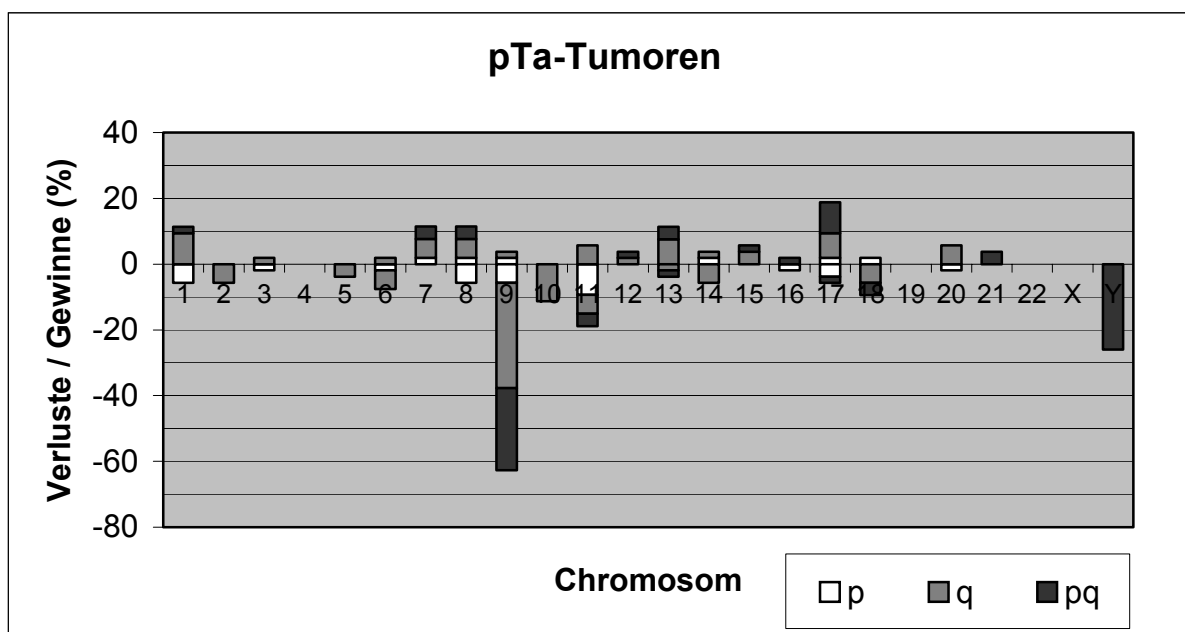


Abb. 5: Chromosomale Veränderungen der gesamten pTa-Tumoren

Wesentliche Verluste wurden zu 60 % am Chromosom 9, 26 % am Chromosom Y, 19 % am Chromosom 11, 11 % am Chromosom 10 und 9 % am Chromosom 18 festgestellt. Verluste am Chromosom 9 waren zu 25 % vollständig, bei 32 % war 9q und bei 6 % 9p betroffen, wobei 9p nur bei einem Tumor allein alteriert war.

Gewinne bei mehr als 4 Tumoren gab es zu 19 % an Chromosom 17, zu 11 % an den Chromosomen 1, 8 und 13 sowie zu 9 % am Chromosom 7.

Chromosom 4 zeigte keine Veränderungen, alle anderen Chromosomen waren mindestens einmal betroffen (Abb. 5).

5.3. Chromosomale Veränderungen nichtrezidivierender Tumoren

Bei den nichtrezidivierenden Harnblasentumoren zeigten sich 63 Chromosomenveränderungen, das sind 2,52 (0-9) Aberrationen pro Tumor. Es traten 38 Verluste auf (durchschnittlich 1,52 (0-7) pro Tumor), welche 60 % der Gesamtaberrationen entsprechen sowie 25 Zugewinne (1,00 (0-8) pro Tumor) mit 40 % der Gesamtaberrationen.

Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, zeigten die nichtrezidivierenden Tumoren folgende Aberrationen in abnehmender Häufigkeit: Gewinne zu 16 % beim Chromosom 7 und bei 12 % der Chromosomen 1, 8, 13, 15 und 17. Verluste traten beim Chromosom 9 zu 52 %, beim Chromosom Y zu 21 % sowie bei den Chromosomen 11, 17 und 18 zu 12 % auf. Keine Chromosomenveränderungen gab es bei den Chromosomen 4, 5 und 21. Alle anderen Chromosomen waren mindestens einmal betroffen. 5 Tumoren hatten keine Aberrationen.

Der Verlust eines gesamten Chromosoms (p+q) zeigte sich in 13 Fällen (34 % der Verluste) sowie der Zugewinn eines gesamten Chromosoms in 9 Fällen (36 % der Gewinne). Verluste am Chromosom 9 fanden sich zu 52 %. Dabei war das gesamte Chromosom zu 28 % und 9q zu 24 % betroffen. Die am häufigsten alterierten Regionen waren 9q31 (13 von 13 Tumoren), 9q22qter (12 von 13 Tumoren) und 9q21qter (11 von 13 Tumoren). Bei Gewinnen am Chromosom 7 (je zu 8 % das gesamte Chromosom bzw. 7q betreffend) war immer die Region 7q32q36 betroffen. Bei den Gewinnen am Chromosom 1 war immer 1q25q41 und bei Chromosom 13 die Region 13q21.2q31 verändert. Beim Chromosom 17 gab es zu 12 % einen Zugewinn des gesamten Chromosoms.

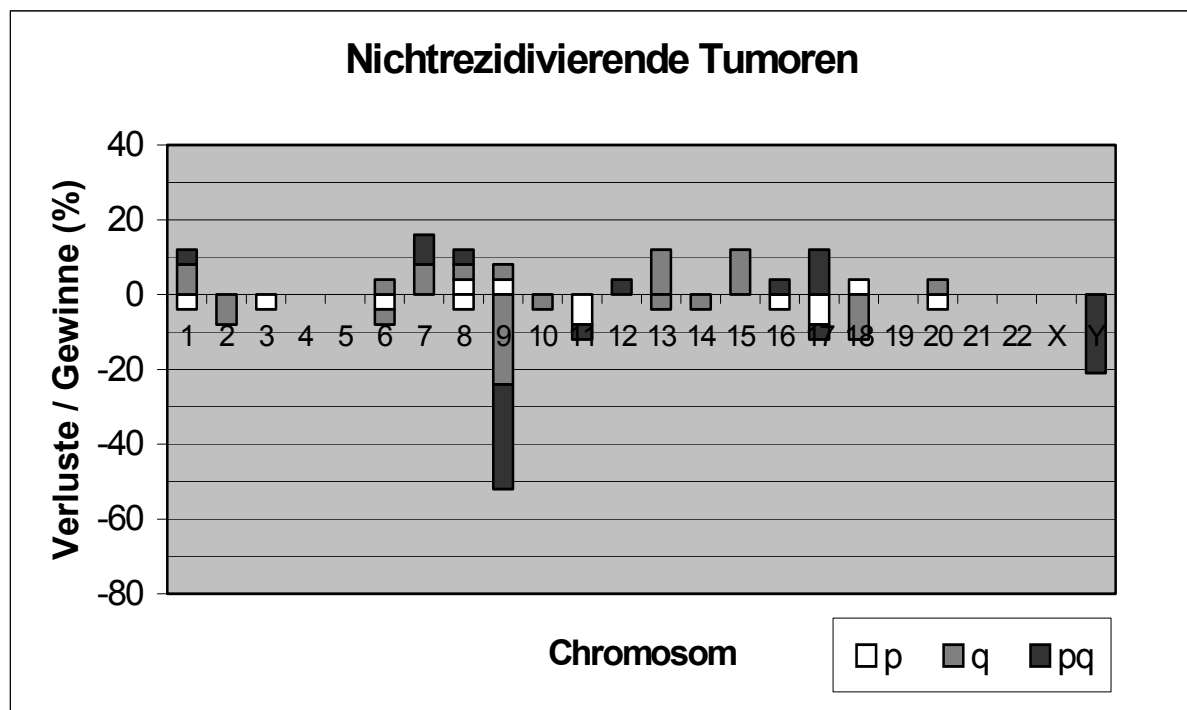


Abb. 6: Chromosomale Veränderungen nichtrezidivierender Tumoren

5.4. Chromosomale Veränderungen rezidivierender Tumoren

Die 28 rezidivierenden Harnblasenkarzinome hatten insgesamt 78 Aberrationen bei einer durchschnittlichen Aberrationszahl von 2,79 (0-10) pro Tumor. Es traten 51 Verluste auf (durchschnittlich 1,82 (0-7) pro Tumor), was 65 % der Gesamt-aberrationen entsprach sowie 27 Zugewinne (0,96 (0-4) pro Tumor) mit 35 % der Gesamtaberrationen. 4 Tumoren hatten keine Aberrationen.

Verluste zeigten sich zu 68 % am Chromosom 9, 32 % am Chromosom Y, 25 % am Chromosom 11 und zu 18 % am Chromosom 10. Zugewinne gab es zu 25 % beim Chromosom 17 und in 11 % an den Chromosomen 1, 8, 11 und 13. Keine Veränderungen zeigten die Chromosomen 4, 15 und 16 (Abb. 7).

Die Verluste am Chromosom 9 betrafen 68 % aller Tumoren mit folgender Beteiligung: zu 21 % das gesamte Chromosom, zu 39 % 9q und/ oder zu 11 % 9p. Die am häufigsten alterierten Regionen am langen Arm waren 9q32 (17 von 17 Tumoren), 9q21q33 (16 von 17 Tumoren) und 9q21qter (15 von 17 Tumoren). Bei

zwei Tumoren gab es Verluste vom gesamten bzw. eines Teils des kurzen Arms: $\text{dim}9\text{pterq}33$ und $\text{dim}(9\text{p}, 9\text{q}21\text{qter})$.

10q war zu 18 % von Verlusten betroffen, bei jedem Befund war 10q24 mit in die Veränderungen einbezogen. Zu 7 % war das gesamte Chromosom 17, zu 14 % 17q und zu 4 % 17p von Zugewinnen betroffen (insgesamt 25 %), die Region 17q22q24 war bei 6 von 7 Tumoren mitbetroffen. Ein Tumor hatte eine Amplifikation bei 17q22q24. Bei Verlusten am Chromosom 11 waren jeweils das gesamte Chromosom zu 4 % und 11q wie auch 11p zu jeweils 11 % betroffen. Es gab einmal eine Amplifikation bei 11q13. Zwei Tumoren zeigten ähnliche Aberrationsmuster: $\text{amp}11\text{q}13$; $\text{dim}(11\text{p}, 11\text{q}14\text{qter})$ und $\text{dim}11$; $\text{enh}11\text{q}13$.

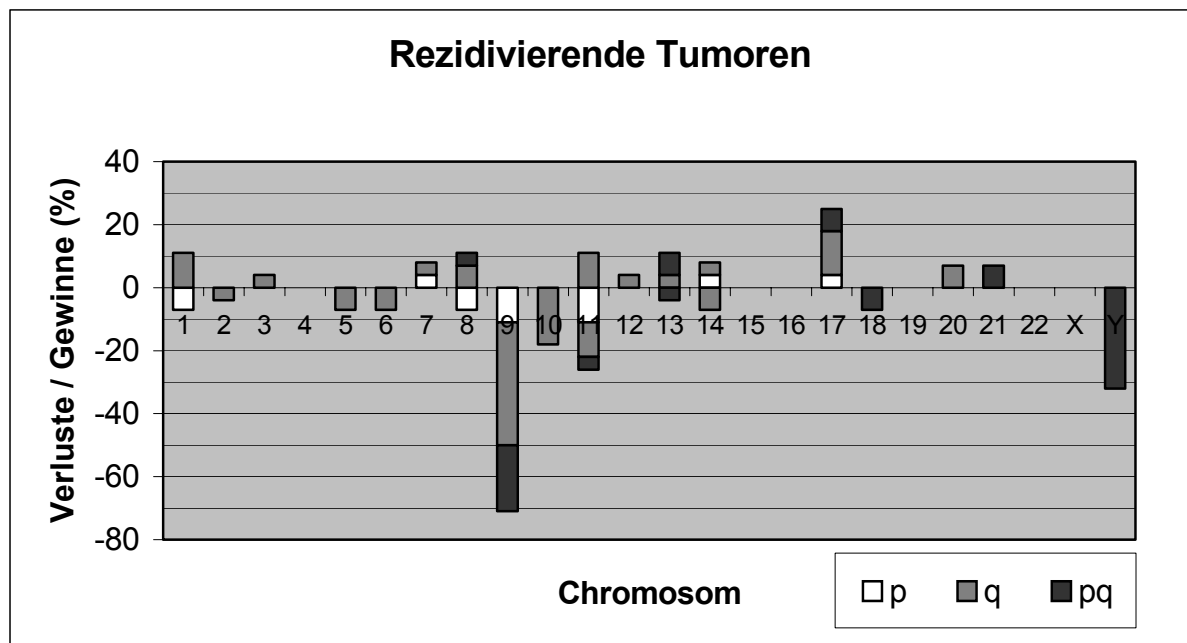


Abb. 7: Chromosomale Veränderungen rezidivierender Tumoren

5.5. Vergleich nichtrezidivierender mit rezidivierenden Tumoren

Die Gesamtaberrationen pro Tumor waren mit 2,52 bei den nichtrezidivierenden im Vergleich zu 2,79 bei rezidivierenden Harnblasentumoren etwa gleich groß. Bei den nichtrezidivierenden Tumoren waren die Verluste pro Tumor mit 1,52 etwas niedriger als bei den rezidivierenden mit 1,82. Die Gewinne pro Tumor waren mit 1,00 (nichtrezidivierend) zu 0,96 (rezidivierend) etwa gleich. Somit war das prozentuale

Verhältnis von Verlusten zu Zugewinnen mit 60 % zu 40 % (nichtrezidivierend) vs. 65 % zu 35 % (rezidivierend) etwa gleich mit leichter Tendenz zu höheren Verlusten bei den rezidivierenden Tumoren.

Abbildung 8 illustriert die ermittelten Chromosomenveränderungen.

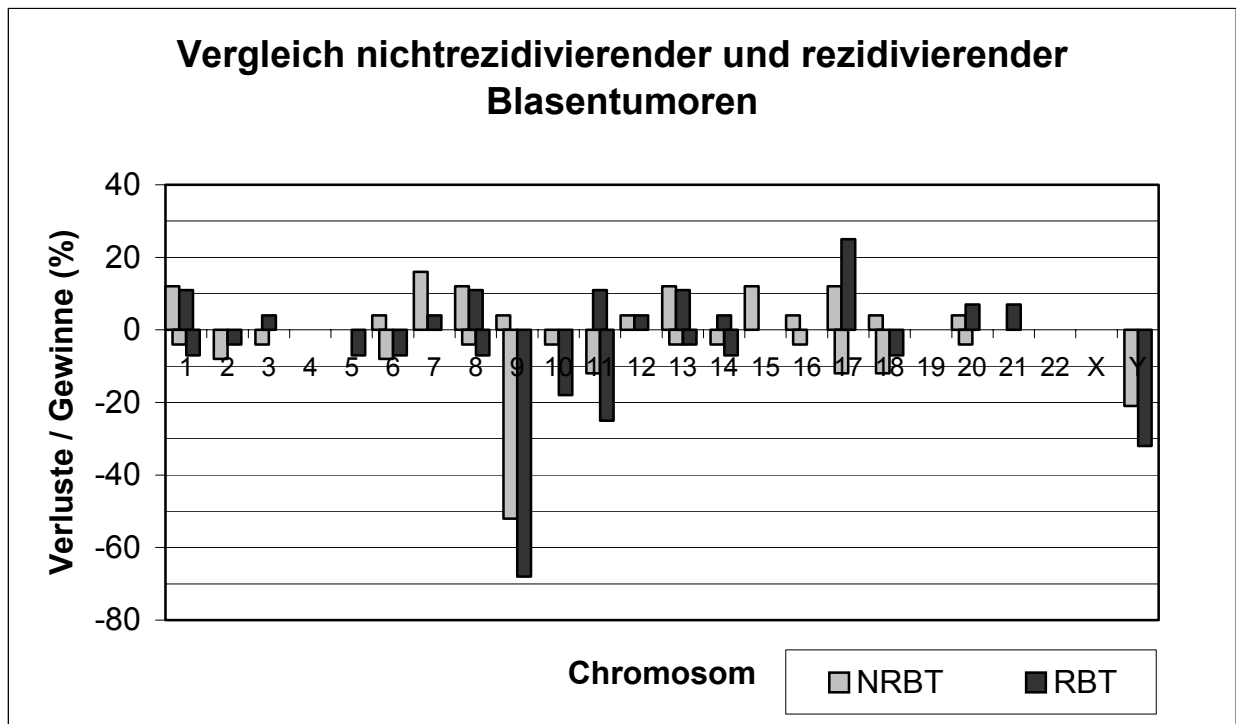


Abb. 8 Vergleich der chromosomalen Veränderungen von nichtrezidivierenden (NRBT) mit rezidivierenden Tumoren (RBT)

Die häufigste Veränderung in beiden Gruppen war der Verlust am Chromosom 9. Es waren dabei von den nichtrezidivierenden Tumoren 52 % und von den rezidivierenden Tumoren 68 % betroffen. Im Vergleich gab es konsekutiv einen Verlust vom gesamten Chromosom in 28 % bzw. 21 % sowie einen Verlust von 9q bei 24 % bzw. 39 %. Verlust an 9p gab es bei 0 % bzw. 11 % der Tumoren. Der gesamte Arm 9q ging bei 1 bzw. 6 Tumoren verloren. Die am häufigsten betroffenen Regionen am Chromosom 9 waren 9q31 und 9q32 (je 29 von 31 Verlusten), 9q22q33 (28 von 31 Verlusten), 9q22qter (27 von 31 Verlusten) und 9q21qter (26 von 31 Verlusten). Chromosom 18 hatte Verluste zu 12 % bzw. 7 %.

Weiterhin ergaben sich gleiche Veränderungen in beiden Gruppen (nichtrezidivierend vs. rezidivierend) an folgenden Chromosomen in über 10 % Häufigkeit: Gewinne mit je 12 % bzw. 11 % an den Chromosomen 1, 8 und 13.

Unterschiede gab es dagegen bei anderen Chromosomenalterationen über 10 %. Bei den nichtrezidivierenden Tumoren gab es im Vergleich zu den rezidivierenden eine erhöhte Anzahl von Verlusten am Chromosom 17 (12 % vs. 0 %), mehr Gewinne gab es an den Chromosomen 7 (16 % vs. 4 %) und 15 (12 % vs. 0 %).

Bei den rezidivierenden Tumoren waren andererseits im Vergleich zur Nichtrezidivgruppe die Chromosomen 10 (18 % vs. 4 %), Y (32 % vs. 21 %) und 11 (25 % vs. 12 %) häufiger von Verlusten betroffen. Am Chromosom 17 war vermehrt ein Zugewinn zu verzeichnen (25 % vs. 12 %) wie auch am Chromosom 11 (11 % vs. 0 %).

5.6. Chromosomale Veränderungen abhängig von der durchschnittlichen rezidivfreien Zeit

Es zeigten sich Unterschiede bezüglich der Anzahl der Aberrationen. In Tabelle 6 sind die Aberrationszahlen in Abhängigkeit von der rezidivfreien Zeit dargestellt. Mit zunehmender rezidivfreier Zeit nahmen diese ab: bei den Tumoren mit bis zu 6 Monaten betrugen die durchschnittlichen Aberrationen 3,6 (0-10) mit 2,0 Verlusten und 1,6 Gewinnen, bei 7-12 Monaten 2,7 (0-5) Aberrationen mit 1,8 Verlusten und 0,8 Gewinnen, bei 13-24 Monaten 2,1 (0-5) Aberrationen mit 1,6 Verlusten und 0,6 Gewinnen sowie bei mehr als 24 Monaten 1,4 (0-2) Aberrationen mit 0,8 Verlusten und 0,6 Gewinnen.

Tab. 6: Aberrationszahlen in Abhängigkeit von der rezidivfreien Zeit

rezidivfreie Zeit	bis 6 Monate	7-12 Monate	13-24 Monate	> 24 Monate
Gesamtaberrationen	3,55 (0-10)	2,67 (0-5)	2,14 (0-5)	1,4 (0-2)
Verluste	2,0	1,83	1,57	0,8
Gewinne	1,55	0,83	0,57	0,6

Bei den einzelnen Chromosomenveränderungen gab es tendenzielle Unterschiede in Hinblick auf die rezidivfreie Zeit (Siehe Tab. 7 und Abb. 9).

Am Chromosom 1 gab es Gewinne von 1q zu 22 % bei Tumoren mit einer rezidivfreien Zeit von bis zu 6 Monaten und 17 % bei 7-12 Monaten sowie Verluste von 1p zu 11 % bei bis zu 6 Monaten.

Verluste am Chromosom 9 waren bei Tumoren mit einer rezidivfreien Zeit von mehr als 24 Monaten mit 40 % weniger vertreten als bei den anderen Gruppen: 77 %, 66 % bzw. 71 %.

Am Chromosom 11 gab es Gewinne zu 22 % bei Tumoren mit bis zu 6 Monaten rezidivfreier Zeit (je 1 Amplifikation 11q13 und 1 Gewinn 11q14) und zu 17 % bei 7-12 Monaten (1 Duplikation 11q13).

Verluste am Chromosom 11 traten zu 44 % (bei Tumoren bis zu 6 Monaten), zu 17 % (7-12 Monate) bzw. zu 20 % (mehr als 24 Monate) auf.

Chromosom 14 war bei Tumoren mit 13-24 Monaten rezidivfreier Zeit zu 14 % mit Verlust betroffen und bei mehr als 24 Monaten zu 20 % vermehrt.

Gewinne am Chromosom 17 gab es mit 44 % häufiger bei Tumoren mit kurzer rezidivfreier Zeit als bei den anderen Gruppen: 17 %, 14 % bzw. 20 %.

Der Verlust von Y variierte in den Gruppen, er betrug bei zunehmender rezidivfreier Zeit 17 %, 50 %, 75 % und 0 %.

Tab. 7: Typische Chromosomenveränderungen in Abhängigkeit von der rezidivfreien Zeit

durchschnittliche Rezidivzeit	bis 6 Monate	7-12 Monate	13-24 Monate	> 24 Monate
Chromosom 1	11 % -p 22 % +q	17 % +q		
Chromosom 9	77 % -p/q	66 % -p/q	71 % -p/q	40 % -p/q
Chromosom 11	22 % +q 44 % -p/q	17 % +q 17 % -p/q		20 % -q
Chromosom 14			14 % -p/q	20 % +p/q
Chromosom 17	44 % +17/+q	17 % +p	14 % +q	20 % +q
Chromosom Y	17 % -Y (6♂)	50 % -Y (4♂)	75 % -Y (4♂)	0 (5♂)

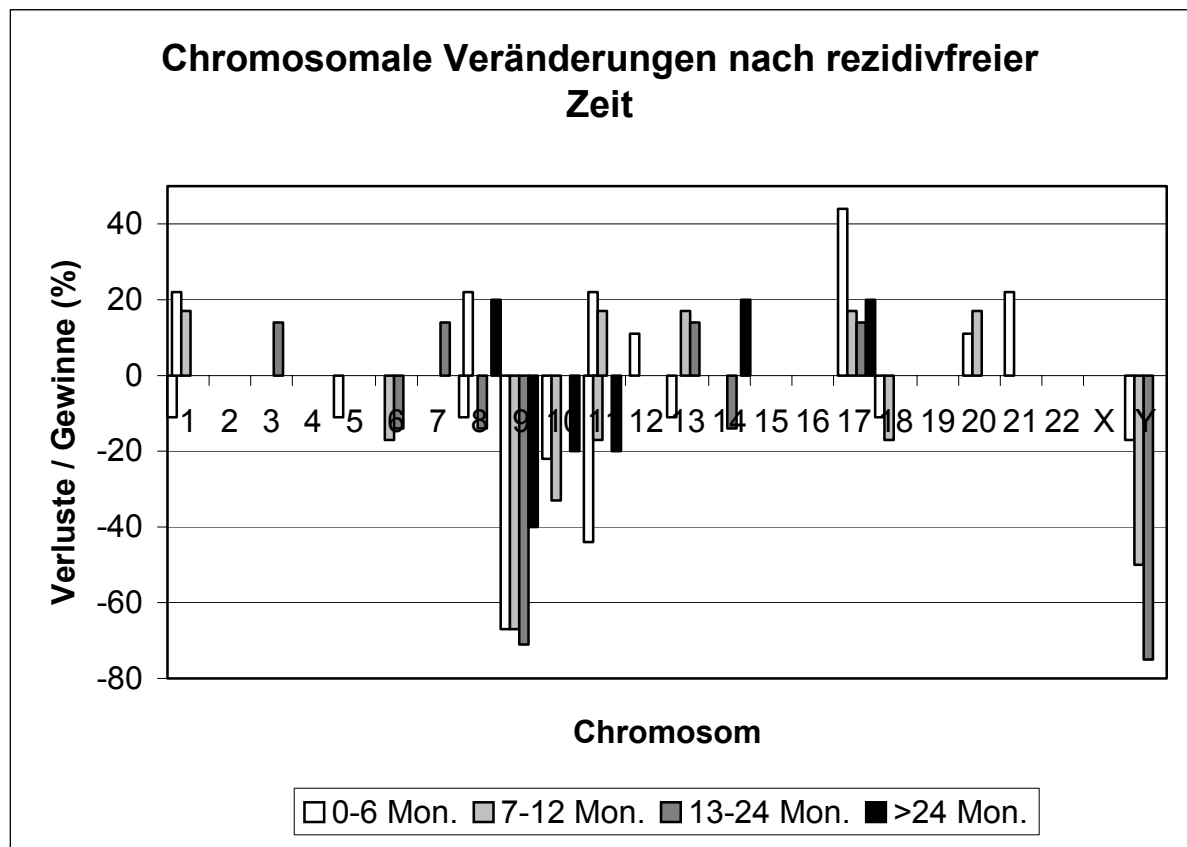


Abb. 9: Chromosomale Veränderungen in Abhängigkeit von der durchschnittlichen rezidivfreien Zeit

Zusammenfassend kann man folgende Tendenzen erkennen:

Mit Abnahme der rezidivfreien Zeit steigt die Anzahl der Aberrationen deutlich an.

Aberrationen an den Chromosomen 1 und 11 finden sich häufiger bei Tumoren mit kurzer rezidivfreier Zeit. Gewinne an Chromosom 17 sind bei schnell rezidivierenden Tumoren höher als bei den Vergleichsgruppen.

5.7. Chromosomale Veränderungen abhängig von der Multifokalität

Bei der Untersuchung chromosomaler Veränderungen der Tumoren wurden bezüglich der Anzahl der Primärtumoren 4 Patienten ausgeschlossen: 3 Patienten hatten primär einen monofokalen Tumor, die CGH wurde aber an einem Rezidiv-

tumor ausgeführt (Patienten 21, 24 und FE15) sowie Patient FeS1, welcher später einen Nierenbecken- und Uretertumor entwickelte.

Die durchschnittliche Aberrationsrate betrug bei monofokalen Tumoren 2,30 bei 1,19 Verlusten und 1,11 Gewinnen. Bei multifokalen Tumoren zeigte sich eine erhöhte Anzahl von chromosomalen Veränderungen von 2,82 je Tumor bei Verlusten von 2,0 und Gewinnen von 0,82 je Tumor. Die Ratio Verlust zu Gewinn betrug in der monofokalen Gruppe 52 % zu 48 % und in der multifokalen Gruppe 71 % zu 29 %.

Im Vergleich zu den multifokalen Tumoren hatten die monofokalen Tumoren vermehrt Gewinne an den Chromosomen 7 (18,5 % vs. 0 %), 15 (11,1 % vs. 0 %) und 17 (22,2 % vs. 13,6 %).

Die multifokalen Tumoren zeigten im Vergleich zu den monofokalen Tumoren vermehrt Gewinne am Chromosom 1 (18,2 % vs. 3,7 %) und Verluste an 8p (13,6 % vs. 0 %), Chromosom 9 (63,6 % vs. 48,1 %), 10q (18,2 % vs. 7,4 %) und Chromosom 11 (22,7 % vs. 14,8 %) (Abb. 10).

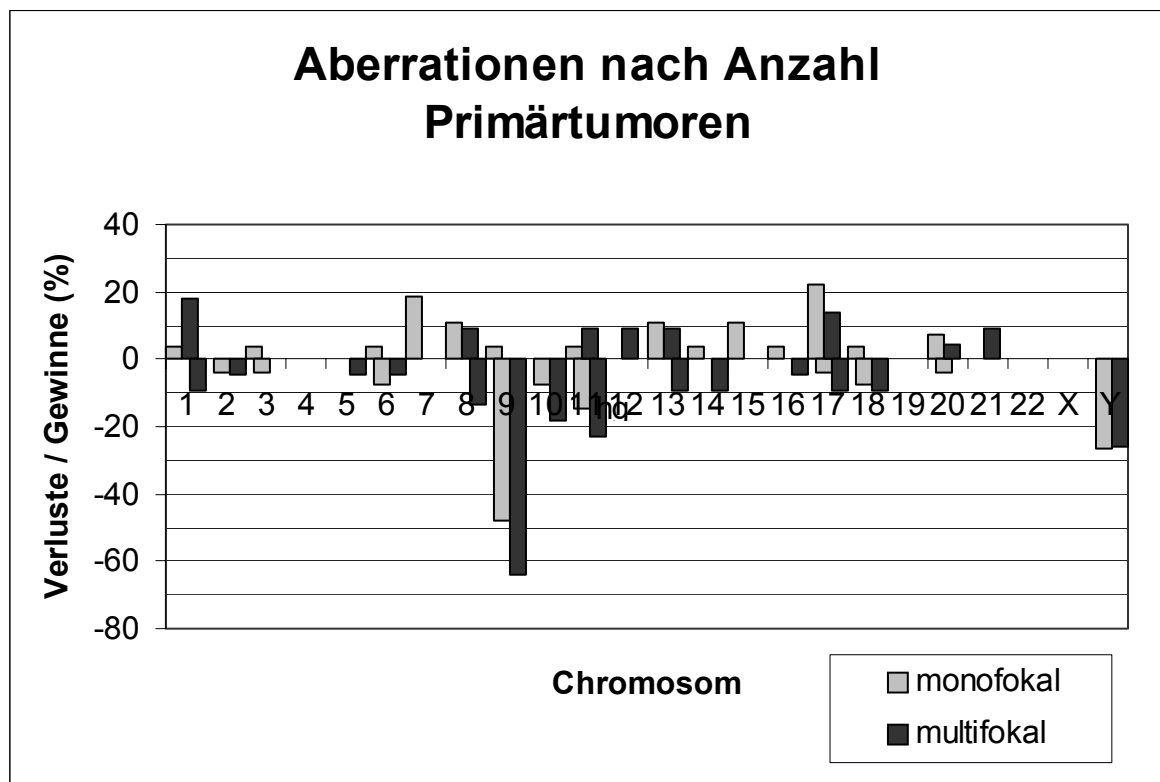


Abb. 10: Chromosomale Veränderungen abhängig von der Anzahl der Primärtumoren

5.8. Chromosomale Veränderungen hinsichtlich des Differenzierungsgrades

Von den 53 in dieser Studie untersuchten Tumoren waren 35 als gut differenziert (G1) und die anderen 18 als mittelgradig differenziert (G2) klassifiziert worden.

Die Aberrationen pro Tumor betrugen bei den G1-Tumoren 2,80 (0-9), die Verluste 1,77 (0-7) und Gewinne 1,03 (0-8). Bei den G2-Tumoren betrugen die Aberrationen 2,39 (0-10), Verluste 1,50 (0-6) und Gewinne 0,89 (0-4) pro Tumor. Die Gesamtaberrationszahl war bei den G1-Tumoren etwas höher als bei den G2-Tumoren, wobei das Verhältnis von Verlust zu Gewinn etwa konstant blieb: jeweils 63 % zu 37 %.

Bei den gut differenzierten Tumoren zeigte Chromosom 4 keine Aberrationen. In über 10 % der G1-Tumoren waren folgende Chromosomen betroffen: Verluste in abnehmender Häufigkeit am Chromosom 9 mit 69 % (2 Tumoren mit Verlust des ganzen p-Armes und Teilen des q-Armes: $\text{del}9(\text{p}, \text{q21qter})$, Chromosom Y mit 31 % und Chromosom 11 mit 14 %.

Gewinne gab es am Chromosom 17 mit 23 % sowie an den Chromosomen 7, 8 und 13 mit je 11 % (Abb. 11).

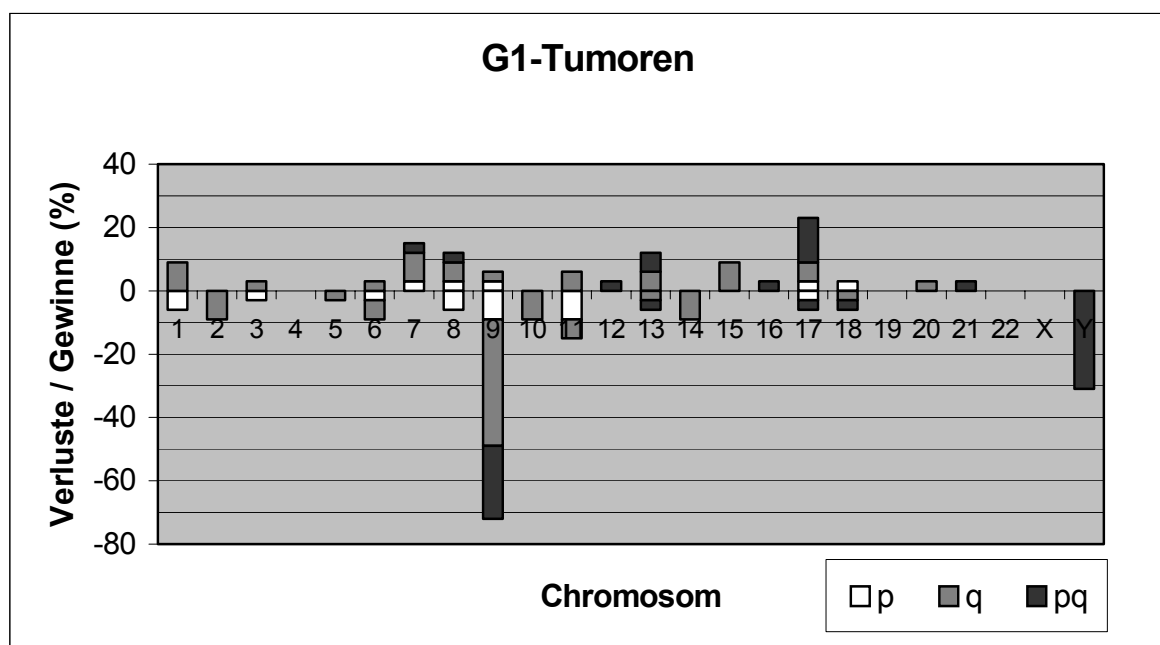


Abb. 11: Chromosomale Veränderungen gut differenzierter Tumoren

Bei den mäßiggradig differenzierten Tumoren waren die Chromosomen 2, 3, 4 und 15 nicht von Aberrationen betroffen.

In über 10 % der G2-Tumoren waren folgende Chromosomen in absteigender Häufigkeit betroffen: Verluste an den Chromosomen 9 mit 44 %, 11 mit 28 %, 10 und 18 mit je 17 % und Y mit 11 %.

Gewinne gab es am Chromosom 1 mit 17 % sowie an den Chromosomen 8, 13, 17 und 20 mit je 11 % (Abb. 12).

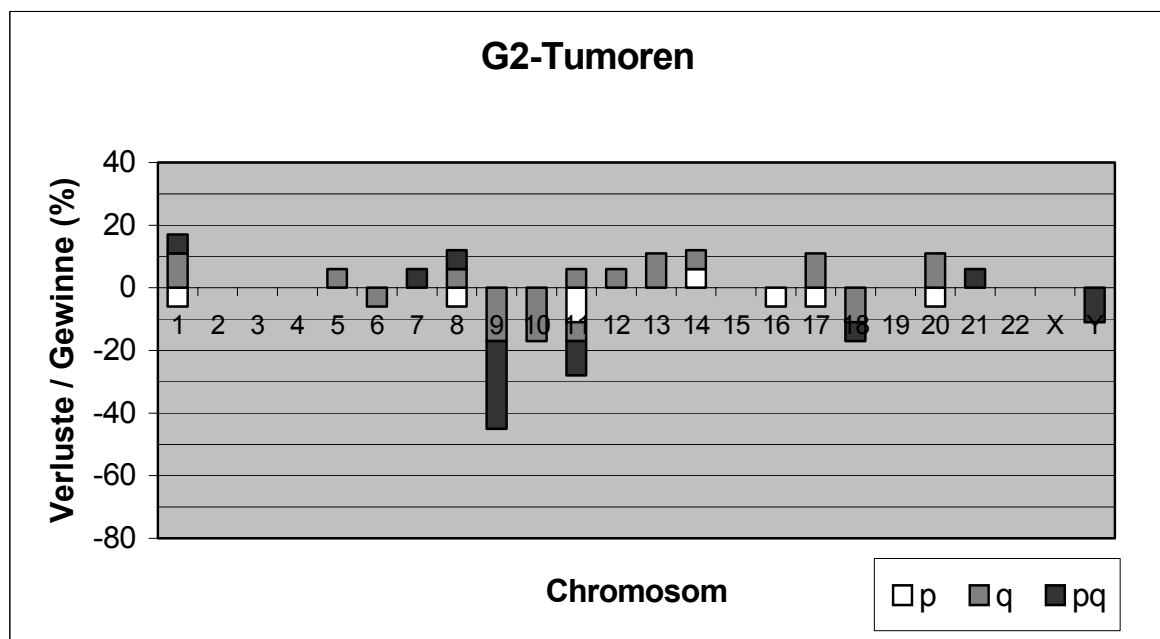


Abb. 12: Chromosomale Veränderungen mäßig differenzierter Tumoren

Eine vergleichende Darstellung chromosomaler Veränderungen gut und mäßig differenzierter Tumoren zeigt Abbildung 13.

Chromosomenaberrationen in gleicher Häufigkeit gab es bei G1- und G2-Tumoren an den Chromosomen 8 und 13 mit je 11 % Gewinn.

Unterschiede zwischen G1- und G2-Tumoren waren bei folgenden Chromosomenveränderungen aufgetreten: Verluste am Chromosom 9 waren bei G1-Tumoren zu 69 % (9 % 9p, 40 % 9q und 23 % Chromosom 9, davon 2 Tumoren mit Verlust von 9p und Teilen von 9q) und bei G2-Tumoren zu 44 % (16,7 % 9q und 27,8 % Chromosom 9) aufgetreten. Das Chromosom Y war mit 31 % deutlich mehr bei den G1- als bei den G2-Tumoren mit 11 % von Verlust betroffen. Ein Verlust am Chromosom 10q trat in 9 % der G1- und in 17 % der G2-Tumoren auf. Einen Verlust

am Chromosom 11 gab es bei G1-Tumoren in 14 % (8,6 % 11p, 5,7 % 11q) und bei G2-Tumoren in 28 % (11% 11p, 6 % 11q und 11 % Chromosom 11).

Verluste am Chromosom 18 gab es zu 6 % bei G1- und zu 17 % bei G2-Tumoren.

An Gewinnen gab es folgende Unterschiede zwischen G1- und G2-Tumoren: bei Chromosom 1 9 % vs. 17 %, bei Chromosom 7 11 % vs. 6 %, Chromosom 20q 3 % vs. 11 % und bei Chromosom 17 23% (3 % 17p, 6 % 17q und 14 % Chromosom 17) vs. 11 % (17q).

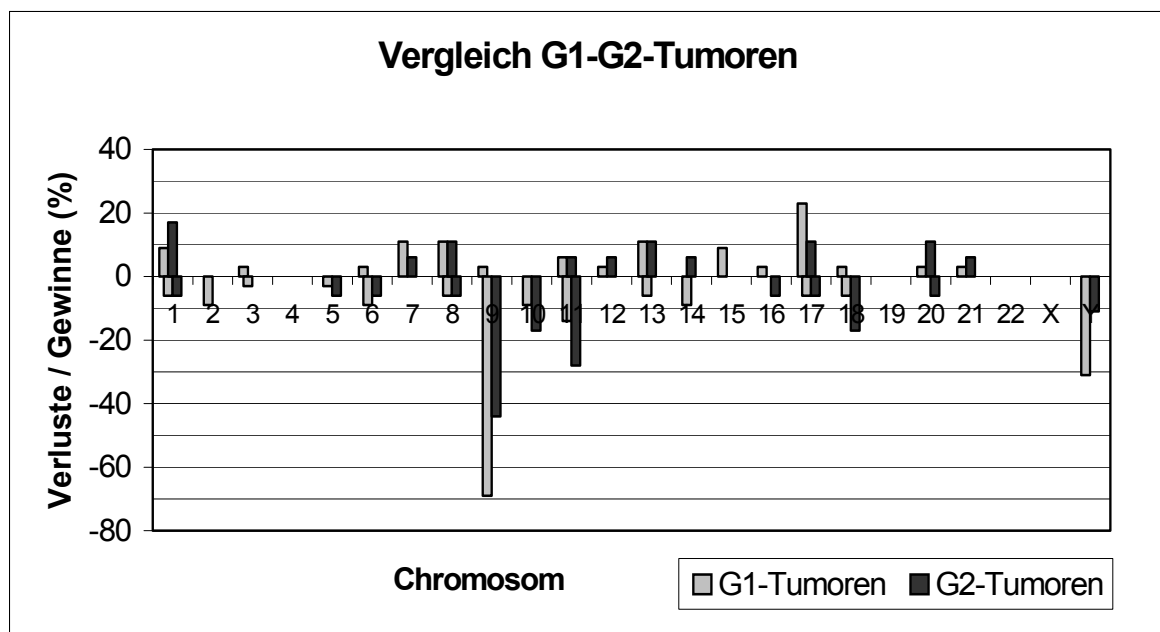


Abb. 13: Vergleich der chromosomalen Veränderungen gut und mäßig differenzierter Tumoren

5.9. Geschlechtsspezifische Veränderungen

Die durchschnittliche Aberrationszahl pro Tumor betrug bei Frauen 3,13 (0-10). Sie setzte sich aus durchschnittlich 1,67 (0-6) Verlusten und 1,47 (0-8) Gewinnen zusammen. Das Verhältnis von Verlusten zu Gewinnen betrug 53 % vs. 47 %. Bei den männlichen Patienten betrug die durchschnittliche Aberrationszahl pro Tumor 2,47 (0-7), welche sich wiederum aus 1,68 (0-7) Verlusten und 0,79 (0-3) Gewinnen zusammensetzte. Das Verhältnis von Verlusten zu Gewinnen lag hier bei 68 % vs. 32 %.

Bei den weiblichen Patienten kamen folgende Aberrationen vor (Abb. 14): Gewinne waren zu 20 % vertreten am Chromosom 17 (7 % 17q und 13 % Chromosom 17) sowie zu je 13 % an den Chromosomen 1, 7, 8 und 20.

Verluste gab es am Chromosom 9 zu 53 % (7 % 9p, 13 % 9q und 33 % Chromosom 9), am Chromosom 10 zu 27 % (10q), am Chromosom 11 zu 20 % (7 % 11p und 13 % Chromosom 11) und an den Chromosomen 1 und 18 mit je 13 %.

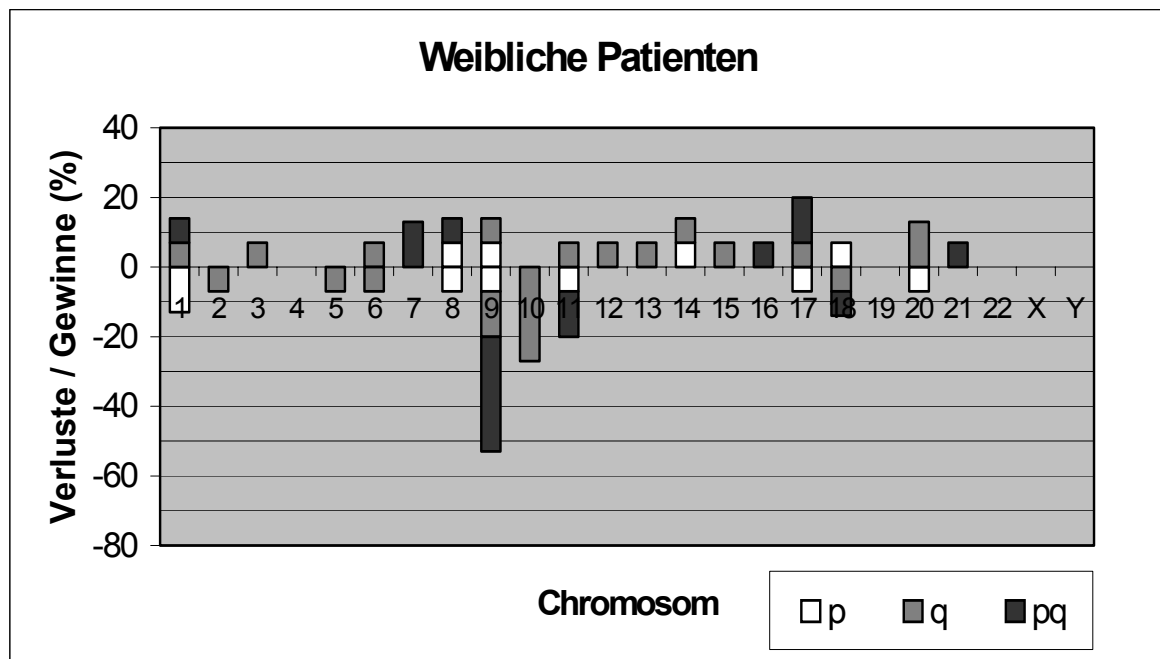


Abb. 14: Chromosomale Veränderungen von Tumoren weiblicher Patienten

Bei den männlichen Patienten gab es folgende Veränderungen (Abb. 15):

Gewinne von 18 % am Chromosom 17 (2,6 % 17p, je 7,9 % 17q und Chromosom 17), 13 % am Chromosom 13 (13q 8 %, Chromosom 13 5 %) sowie je 11 % an den Chromosomen 1 (1q) und 8. Verluste traten auf am Chromosom 9 bei 63 % der Tumoren (5 % 9p und/ oder 40 % 9q sowie 21 % Chromosom 9), weiterhin am Y-Chromosom mit 26 % und Chromosom 11 mit 18 % (10,5 % 11p und 7,9 % 11q). Keine Aberrationen gab es bei den Chromosomen 4 und 20.

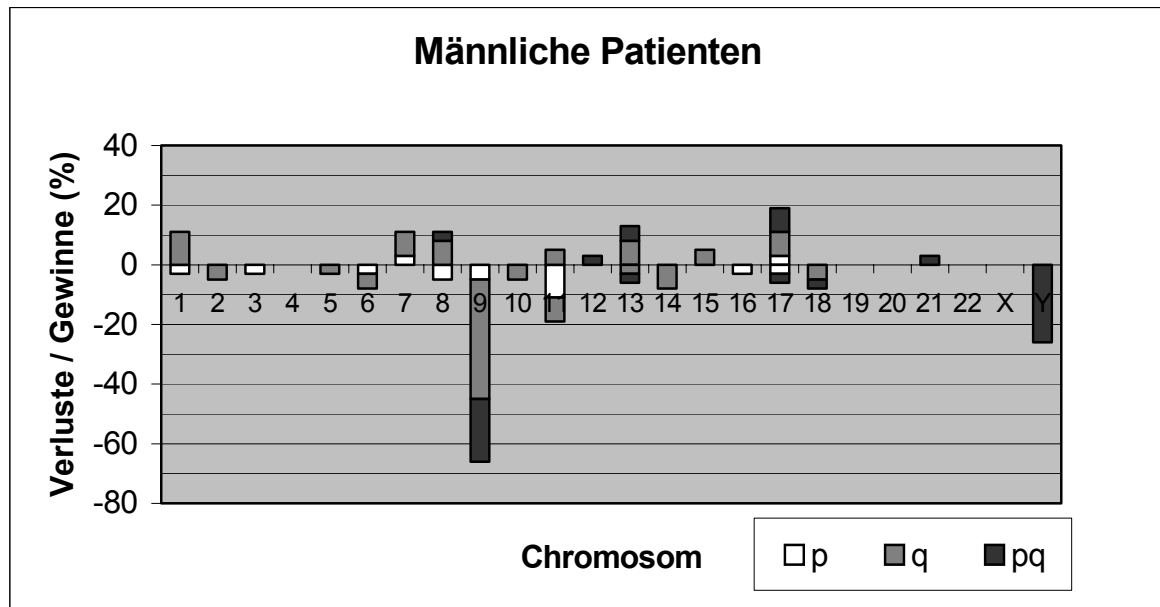


Abb. 15: Chromosomale Veränderungen von Tumoren männlicher Patienten

Weibliche und männliche Patienten zeigten Gemeinsamkeiten bei nachfolgenden Aberrationen: Gewinne am Chromosom 1 mit 13 % vs. 11 %, am Chromosom 7 mit 13 % vs. 8 %, am Chromosom 8 mit 13 % vs. 11 %, am Chromosom 13 mit 7 % vs. 13 % und am Chromosom 17 mit 20 % vs. 18 %. Verluste waren gleich am Chromosom 9 mit 53 % vs. 63 %, am Chromosom 11 mit 20 % vs. 18 % und am Chromosom 18 mit 13 % vs. 8 %. Unterschiede bestanden an folgenden Chromosomen (weiblich vs. männlich): Gewinne an Chromosom 20 mit 13 % vs. 0 % sowie Verluste an Chromosom 1 mit 13 % vs. 3 % und Chromosom 10 mit 27 % vs. 5 %.

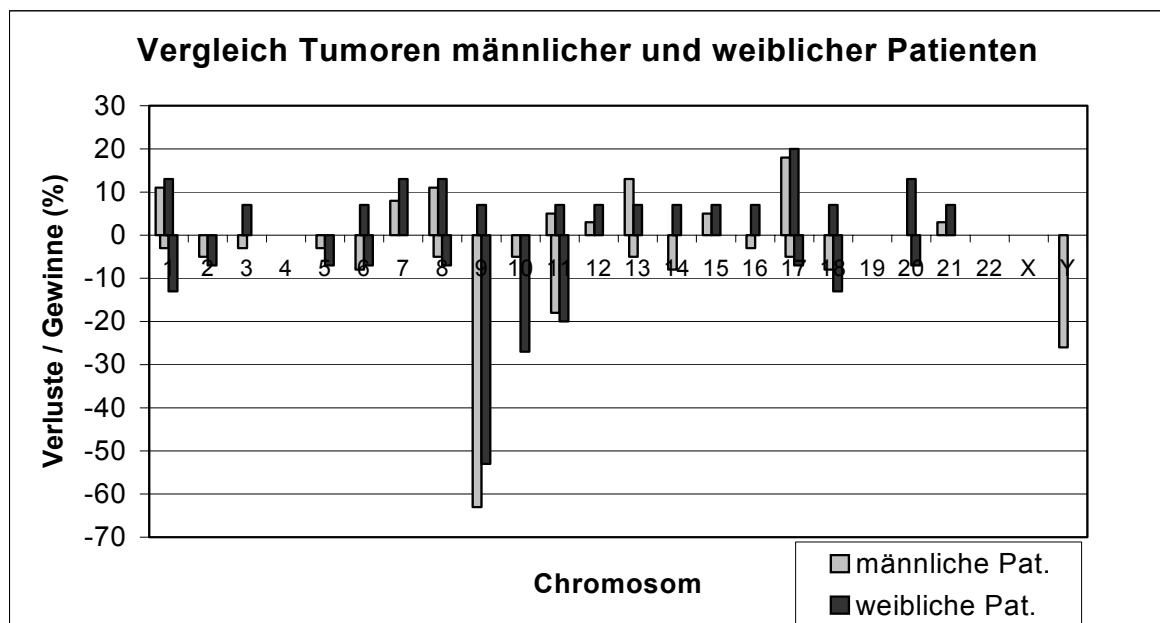


Abb. 14: Chromosomale Veränderungen von Tumoren weiblicher und männlicher Patienten

6. Diskussion

6.1. Morphologische und biologische Tumorkriterien der Rezidivität

Eine besondere Eigenschaft der oberflächlichen Harnblasenkarzinome ist ihre hohe Rezidivneigung. 60-80 % der Patienten erleiden nach kompletter transurethraler Resektion innerhalb von 4 Jahren Tumorrezidive (Böhle and Jocham 1998; Stein et al. 1998). Weiterhin haben Patienten mit multiplen primären Blasentumoren ein erhöhtes Risiko eines höhergradigen Tumorrezidivs (Fitzpatrick et al. 1986) sowie einer Progression des Tumorleidens (Adshead et al. 1998). Bei einem Rezidiv bzw. Neuauftreten eines Blasentumors innerhalb von 3 Monaten nach Erstresektion erhöht sich das Risiko eines erneuten Tumorrezidivs von ca. 20 % auf 70 bis 85 % (Lutzeyer et al. 1982; Fitzpatrick et al. 1986). In der vorliegenden Studie haben 43 % der Patienten mit monofokalen Tumoren und 64 % mit multifokalen Tumoren ein oder mehrere Rezidive entwickelt. Dies spricht für den großen Einfluß der primären Tumoranzahl, zeigt aber auch, daß fast die Hälfte der zum Zeitpunkt der Resektion monofokalen Tumoren später rezidierten. Ergebnisse anderer Autoren bestätigen, daß Patienten mit multiplen primären Blasentumoren ein doppeltes Risiko hatten, ein Tumorrezidiv zu erleiden im Vergleich zu Patienten mit einem solitären primären Blasentumor (Parmar et al. 1989). Das Rezidivrisiko stieg für pTa-Tumoren von 18 % auf 43 % an (Heney et al. 1983).

Die Multifokalität stellt zudem ein erhöhtes Risiko für ein verkürztes rezidivfreies Intervall dar (Heney et al. 1983). In den eigenen Untersuchungen war die durchschnittliche rezidivfreie Zeit der multifokalen Tumoren mit 10,2 Monaten deutlich kürzer als die bei den monofokalen Tumoren mit 17,5 Monaten.

In diesem Kontext ist zu sehen, daß die Rate der Frührezidive unter anderem auch durch Residualtumoren nach Tumorresektion beeinflusst wird, diese beträgt unter Weißlicht 25,2 bis 59,4 %. Weiterhin können kleine Tumoren vor allem bei multilokulären Harnblasenkarzinomen übersehen werden und als Frührezidiv imponieren (Klan et al. 1991; Filbeck et al. 2003). Mittels PDD-Diagnostik können Residualtumoren vermindert und das krankheitsfreie Überleben signifikant verlängert werden (Filbeck et al. 2003). Die in der eigenen Arbeit beschriebenen Tumorresektionen wurden unter Weißlicht durchgeführt. Man muß deshalb davon ausgehen, daß bei

einem Teil der Patienten verbliebene Tumoren die Ursache für spätere Rezidive waren. Jedoch sind auch nichtrezidivierende Tumoren untersucht worden, welche zum Teil als ausgedehnt und/ oder multilokulär beschrieben wurden. Deren Träger blieben innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 33-110 Monaten rezidivfrei und waren somit radikal reseziert worden.

Die eigenen Patienten mit nichtrezidivierenden Tumoren sind im Durchschnitt 70 Monate nachbeobachtet worden. Kurth et al. gaben die durchschnittliche Zeit bis zum ersten Rezidiv mit 21,5 Monaten an (Kurth et al. 1992). Demgegenüber beträgt die im eigenen Patientengut vorhandene durchschnittliche rezidivfreie Zeit 16 Monate, wobei diese von 2 bis 84 Monaten variierte. Es ist somit nicht sicher auszuschließen, daß ein Patient mit der Einteilung zur Gruppe der nichtrezidivierenden Tumoren dennoch ein Spätrezidiv entwickeln könnte. Dieses Risiko besteht durchaus und kann die Ergebnisse beeinflussen.

Die Größe der untersuchten Primärtumoren betrug konsekutiv durchschnittlich 20 mm (monofokal rezidivierend) bzw. 35 mm (multifokal rezidivierend) und 19 mm (monofokal nichtrezidivierend) bzw. 35 mm (multifokal nichtrezidivierend). Es zeigte sich eine Korrelation zur Multifokalität, nicht jedoch zur Rezidivität. In der Literatur wird von der Tumorgröße als Prognosefaktor bezüglich Rezidivität berichtet (Heney et al. 1983; Kurth et al. 1992). Die gewisse Diskrepanz zu diesen Studien könnte der geringen Tumoranzahl angelastet werden. Nach Kurth et al. ist insgesamt die Tumoranzahl zum Zeitpunkt der Erstresektion der wichtigste Prognosefaktor hinsichtlich Rezidivanzahl und rezidivfreier Zeit. Tumorgröße, Tumorgad und vorhergehende Rezidivanzahl besitzen ebenfalls großen prognostischen Wert bezüglich eines Progresses und der Überlebensrate (Kurth et al. 1992).

6.2. Chromosomenveränderungen der pTa-Tumoren

Die eigenen untersuchten Harnblasenkarzinome hatten eine Gesamtaberrationszahl von 2,66 bei Gewinnen von 0,98 und Verlusten von 1,68 pro Tumor. Dies entspricht den Ergebnissen von Richter et al., welche eine Gesamtaberration von 2,3 bei 1,4 Verlusten und 0,9 Gewinnen pro pTa-Tumor ermitteln konnten (Richter et al. 1997). Simon et al. berichteten von 3,7 Aberrationen pro Tumor, wobei allerdings 3 G1- und

17 G2-Tumoren untersucht wurden (von den eigenen Tumoren waren 35 G1- und 18 G2-differenziert) (Simon et al. 1998).

Für die pTa-Harnblasentumoren konnten gehäuft Chromosomenaberrationen ermittelt werden, welche mit denen anderer Autoren vergleichbar hoch waren.

Gewinne traten auf bei Chromosom 17 zu 19 %, den Chromosomen 1, 8 und 13 zu 11 % und Chromosom 7 zu 9 %. Simon et al. ermittelten Gewinne an den Chromosomen 7 und 8 zu jeweils 10 %, 11q13 zu 25 %, an Chromosom 17 zu 30 % und 20q zu 15 % (Simon et al. 1998). Richter et al. konnten bei pTa-Tumoren Gewinne an den Chromosomen 1 bei 14 %, 7p und 7q bei je 7 %, 8q bei 10 % sowie 17q und 20q zu je 7 % zeigen (Richter et al. 1997). Eine größere Diskrepanz bestand beim Chromosom 11, Simon et al. beschreiben hier 25 % Gewinne. Bei Richter et al. waren 2 von 28 Tumoren und im eigenen Untersuchungsgut 3 von 53 Tumoren betroffen.

Im eigenen Untersuchungsgut gab es Verluste bei den Chromosomen 9 mit 60 %, 10 mit 11 %, 11 mit 19 %, 18 mit 9 % und Y mit 26 %. Ähnliche Verlustmuster fanden Richter et al., wobei in mehr als einem Fall die Chromosomen 8p (7 %), 9p (39 %), 9q (54 %), 11 (10 %) und Y (25 %) betroffen waren (Richter et al. 1997). Bei Simon et al. beliefen sich die Verluste bei 5q auf 20 %, 8p auf 15 %, Chromosom 9 auf 55 %, 11p und q gesamt auf 15 %, 13q auf 20 % und 18q auf 10 %. Das Y-Chromosom ging bei 2 von 20 Tumoren verloren, der Anteil der männlichen Patienten war nicht angegeben (Simon et al. 1998).

Es zeigten sich im Vergleich der eigenen Tumoren gegenüber den Ergebnissen von Richter et al. und Simon et al. konsekutiv leicht vermehrte Verluste an den Chromosomen 10 (eigene Tumoren gesamt 11 % Verlust an 10q gegenüber 4 % bzw. 5 %), 11 (eigene Tumore Verlust an 11p zu 13 % vs. 4 % bzw. 10 %) sowie 17 (eigene Tumore 6 % vs. 0 % bzw. 5 %). Etwas weniger waren eigene Verluste auf 8p (6 % vs. 7 % bzw. 10 %). Die Aberrationsrate an den Chromosomen 5 (5q) und 13, wie von Simon et al. gezeigt, korreliert nicht mit den Ergebnissen von Richter et al. und den eigenen (Richter et al. 1997; Simon et al. 1998).

Zusammengefaßt sind die ermittelten Chromosomenaberrationen mit denen von Richter et al. und Simon et al. zum größten Teil vergleichbar. Das deutet auf relativ spezifische chromosomale Veränderungen nichtinvasiver Harnblasenkarzinome hin, welche zwar häufig die Ausbildung von Rezidivtumoren begünstigen, andererseits aber kaum invasives Potential im Sinne eines hohen Progreßrisikos besitzen (Koontz

et al. 1985). Das scheint sie von den beginnend invasiven Tumoren im Tumorstadium pT1 zu unterscheiden, welche häufiger einen Progreß zeigen. PT1-Tumoren weisen im Vergleich zu pTa-Tumoren deutlich mehr Alterationen auf: Verluste von 2q, 4q, 5q, 8p, 10q, 11p, 17p sowie 18q und Gewinne auf 1q, 2p, 3p, 3q, 5p, 6p, 8q und 10p. Auf diesen Chromosomen werden Tumorsuppressorgene bzw. Onkogene vermutet, welche eine Rolle bei der Tumorprogression spielen sollen. Im Gegensatz dazu waren Verluste von Chromosom 9 bei pTa-Tumoren mit 16 von 28 deutlich höher als bei pT1-Tumoren mit 10 von 28. Zum einen spricht dies gegen eine Rolle von Chromosom 9 beim Tumorprogreß, weiterhin kann man annehmen, daß ein Großteil der pT1-Tumoren sich nicht aus pTa-Vorläufern entwickelt (Richter et al. 1997; Simon et al. 1998).

6.3. Chromosomale Veränderungen der rezidivierenden und nichtrezidivierenden Tumoren

Die Gesamtaberrationsrate bei nichtrezidivierenden und rezidivierenden Tumoren ist mit 2,52 bzw. 2,79 annähernd gleich mit einer Tendenz zu eher höheren Aberrationszahlen bei rezidivierenden Tumoren. Verluste traten zu 1,52 bzw. 1,82 und Gewinne zu 1,00 und 0,96 auf.

Zhao et al. konnten in ihren Untersuchungen bei dem Vergleich von 2 Gruppen pTa-Tumoren mit <4 bzw. ≥ 4 Gesamtaberrationen pro Tumor keine Korrelation zur Rezidivität dieser Tumoren finden (Zhao et al. 1999).

Im Gegensatz dazu werden deutliche Unterschiede zwischen pTa- und pT1-Tumoren beschrieben. Richter et al. und Simon et al. untersuchten zugleich pT1-Tumoren, welche im Schnitt 6,5 bzw. 9,8 Aberrationen pro Tumor trugen (Richter et al. 1997; Simon et al. 1998). Diese erhöhte Anzahl an Chromosomenveränderungen weist auf eine erhöhte genetische Instabilität und somit ein erhöhtes Aggressionspotential der pT1-Tumoren hin, welche mit 30 % eine deutlich höhere Progreßwahrscheinlichkeit als pTa-Tumoren mit gleich und mehr als 4 % haben (Koontz et al. 1985). In dem Zusammenhang ist zu sehen, daß Simon et al. eine deutlich höhere Anzahl von Aberrationen in pT1G2- als in pTaG2-Tumoren nachweisen konnten. Das wird darauf zurückgeführt, daß zumindest ein Teil der pT1-Tumoren sich nicht über pTa-Tumoren

entwickeln (Simon et al. 1998). Der Zusammenhang von Tumorstadium und Rezidivität wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben (Di Silverio et al. 1992; Kurth et al. 1992; Neuhaus et al. 1999).

Im Vergleich der nichtrezidivierenden mit den rezidivierenden Tumoren zeigte sich in dieser Arbeit ein zum Teil unterschiedliches Verteilungsmuster chromosomaler Aberrationen. Während die nichtrezidivierenden im Gegensatz zu den rezidivierenden Tumoren mehr Verluste an dem Chromosom 17 und Gewinne an den Chromosomen 7 und 15 ausprägten, zeigten sich bei den rezidivierenden Tumoren vermehrt Verluste an den Chromosomen 9, 10, 11 und Y sowie Gewinne an den Chromosomen 11 und 17.

Es folgen nun Ausführungen zu einzelnen Chromosomenveränderungen.

Zugewinne an Chromosom 7 zeigten sich häufiger bei nichtrezidivierenden Tumoren mit 16 % (zweimal Gewinn von Chromosom 7, je einmal von 7q und 7q32-q36). Bei rezidivierenden Tumoren gab es nur einen Tumor (4 %, 7q21qpter) mit derartigen Veränderungen. Diese Daten stehen im Gegensatz zu denen anderer Autoren.

Trisomie 7 wird in verschiedenen Studien eng mit der Rezidivität und dem Progreß oberflächlicher Tumoren in Verbindung gebracht. Bei Untersuchungen mittels FISH-Technik (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) zeigten Watters et al. bei 0 von 20 nichtrezidivierenden und 10 von 32 rezidivierenden Blasentumoren, wie auch Bartlett et al. an 25 Patienten, eine strenge Korrelation einer Aneusomie der Chromosomen 7 und/ oder 17 zur Rezidivität bei primären pTa/1-Tumoren. Zu 80 % waren beide Chromosomen zugleich vermehrt (Bartlett et al. 1999; Watters et al. 2000). Eine frühere Untersuchung von Bartlett et al. zeigte noch an ähnlichem Patientengut eine moderate Korrelation von Polysomie 7 und 17 zur Rezidivität (Bartlett et al. 1998). Pycha et al. konnten Polysomie 7 bei keinem der nichtrezidivierenden pTa-Tumoren nachweisen, wohl aber zu 61 % in rezidivierenden und 100 % in Tumoren mit Progreß im Rezidiv. Zugleich ist Polysomie 7 vermehrt in fortgeschrittenen Tumoren beschrieben worden (Pycha et al. 1997). Das oben beschriebene simultane Auftreten eines Gewinnes der Chromosomen 7 und 17 von 80 % konnte bei den eigenen Tumoren nicht nachvollzogen werden und kam nur bei einem nichtrezidivierenden Tumor vor.

Bei den eigenen Tumoren waren vier gut und einer mäßig differenziert. Bartlett et al. konnten eine Korrelation von Aneusomie von Chromosom 7 zum Tumorgrad (8,5 %

aller G1- und 49 % aller G2/3-Tumoren) und Tumorstadium nur unter Einbeziehung invasiver Rezidivtumoren nachweisen. Bei Betrachtung der pTa/1-Tumoren bestand dieser Zusammenhang nicht (Bartlett et al. 1999).

Im Vergleich zu den genannten Arbeiten wären bei den rezidivierenden bzw. mittelgradig differenzierten Tumoren deutliche Zugewinne an Chromosom 7 zu erwarten gewesen, das Gegenteil ist der Fall. Gewinne an Chromosom 7 sind hier bei nichtrezidivierenden gut differenzierten Tumoren häufiger.

Eine Ursache für diese Unterschiede könnte in den verschiedenen Detektionstechniken liegen. Mit der CGH wird ein generelles Screening des Genomes durchgeführt, Subklone eines Tumors können unter einer bestimmten Grenze nicht mehr nachgewiesen werden. Dieser Nachweis ist bei der FISH möglich. So ermittelten Pycha et al. Aberrationen an Chromosom 7 bei 93,6 % invasiver Harnblasentumoren sowie zu gleichem Anteilen, aber weit geringerer Intensität an benachbartem Normalgewebe (Pycha et al. 1999). Andere CGH-Untersuchungen an pTa-Tumoren erbrachten ebenfalls eine Aberrationsrate von Chromosom 7 zu 7 % bzw. 10 %, was für diese Theorie spricht (Richter et al. 1997; Simon et al. 1998).

Eine Rolle bei der Rezidivität oberflächlicher Blasentumoren könnte das Oncogen c-erbB1 auf 7p11-p12 spielen. Die Expression des von ihm codierten EGF-Rezeptors (Epidermal Growth Factor) ist bei rezidivierenden im Gegensatz zu nichtrezidivierenden Tumoren erhöht, dies erreicht aber keine statistische Signifikanz (Mellon et al. 1995; Yan et al. 2002). In den eigenen analysierten nichtrezidivierenden Tumoren sind in je 2 Fällen das Chromosom 7 und 7q vermehrt, was gegen eine Beteiligung von c-erbB1 in dieser Tumorentität spricht.

Aus den eigenen Daten ist eine Korrelation einer Polysomie 7 mit einer erhöhten Rezidivität der pTa-Harnblasenkarzinome nicht nachzuweisen.

Gewinne am Chromosom 17 zeigten hingegen eine deutliche Assoziation zur Tumorzusammenhang Rezidivität. Nichtrezidivierende Tumoren waren mit 3 Zugewinnen zu 12 % von einer Polysomie betroffen, während rezidivierende Tumoren insgesamt 25 % Zugewinne an Chromosom 17 hatten: je zweimal an Chromosom 17 und 17q sowie je einmal an 17q21qter und 17p und eine Amplifikation von 17q22q24. Dies entspricht Angaben aus der Literatur.

So berichten Watters et al. und Bartlett et al. über eine strenge Korrelation von Polysomie der Chromosomen 7 und/ oder 17 mit der Rezidivität von pTa/1-Tumoren

mit einem erhöhten Rezidivrisiko von 3,62 in der multivariaten Analyse (Bartlett et al. 1999; Watters et al. 2000). Neuhaus et al. konnten eine Aneusomie von 17 im Vergleich mit Tumorstadium und –grad als einen unabhängigen Prognosefaktor für Rezidivität und Progreß von 67 pTa-Tumoren nachweisen, 19 % zeigten diese Veränderung. Desweiteren bestand eine deutliche Assoziation von Aneusomie 17 zum Tumorgrad und im Vergleich der pTa- mit pT1-Tumoren zum Tumorstadium. Für pT1-Tumoren hatte eine Aneusomie von 17 keinen prognostischen Wert (Neuhaus et al. 1999). Im Unterschied zu Bartlett et al. und Neuhaus et al. konnte ein gehäufte simultaner Gewinn von Chromosom 17 mit anderen Chromosomenaberrationen (wie Polysomie 1 oder 7) nicht festgestellt werden.

Richter et al. und Simon et al. hatten in ihren CGH-Untersuchungen an pTa-Tumoren Gewinne an Chromosom 17 zu 11 % bzw. 30 % nachgewiesen. Dies entspricht in etwa den eigenen Ergebnissen. Ein Vergleich ist dennoch bedingt möglich, da das Rezidivverhalten der dort untersuchten Tumoren nicht bekannt ist (Richter et al. 1997; Simon et al. 1998).

Das Oncogen c-erbB2 (HER-2/ neu) liegt auf dem Chromosomenabschnitt 17q21, es codiert für einen Rezeptor der EGF-Rezeptorfamilie. Seine Expression in oberflächlichen Tumoren wird allerdings unabhängig von der Rezidivität beschrieben (Pich et al. 2002; Yan et al. 2002).

Kandidatengene auf 17q24-25 mit einer möglichen Rolle bei der Tumorentstehung sind die Thymidinkinase 1 sowie der Apoptoseinhibitor 4 (API4) (Edwards et al. 2001). API4 codiert für Survivin, welches in der G2/ M-Phase die Apoptose inhibiert. Eine erhöhte Expression könnte zu einer Deregulierung mit erhöhter Rezidivität führen. Diesbezüglich werden in der Literatur widersprüchliche Angaben gemacht. Gazzaniga et al. konnten im Gegensatz zu Swana et al. diesbezüglich keinen Zusammenhang feststellen (Swana et al. 1999; Gazzaniga et al. 2003). Weitere Untersuchungen sind zur Klärung dieses Sachverhaltes erforderlich.

Desweiteren traten Verluste am Chromosom 17 nur bei nichtrezidivierenden Tumoren auf, einmal von Chromosom 17 und zweimal von 17p. Diese Veränderungen waren bei 5 % bzw. 0 % der Tumoren von Simon et al. und Richter et al. nachweisbar (Richter et al. 1997; Simon et al. 1998).

Ob p53 auf dem kurzen Arm des Chromosom 17 bei der Rezidivität von pTa-Tumoren eine Rolle spielt ist fraglich, da sein Funktionsverlust oft mit einem Verlust von 17p einhergeht und mit Invasivität in Verbindung gebracht wird (Sidransky et al.

1991; Sarkis et al. 1993). Pycha et al. konnten allerdings in Untersuchungen an 29 pTa-Tumoren eine Polysomie 17 und eine erhöhte p53-Expression in rezidivierenden Tumoren (13 Tumoren ohne und 7 Tumoren mit Progreß), nicht jedoch in nicht-rezidivierenden Tumoren nachweisen, wobei beide Marker in 9 von 10 Fällen zusammen auftraten (Pycha et al. 1997). Yan et al. ermittelten bei 270 pTa/1-Tumoren einen signifikanten Zusammenhang von p53-Nachweis und einem zweiten Tumorrezidiv (Yan et al. 2002), Schmitz-Dräger et al. konnten ähnliche Ergebnisse nachweisen (Schmitz-Dräger B.J. 1995). Ein Zusammenhang von p53-Akkumulation und einem Progreß oberflächlicher Tumoren wurde in der Literatur mehrfach angegeben (Sarkis et al. 1993; Kuczyk et al. 1994; Schulz et al. 1998).

Bei anderen Untersuchungen stellten p53, KI-67, p21 bzw. MDM2 keine unabhängigen Prognosefaktoren dar, weder bezüglich Rezidivität und Progreß im Vergleich zum Tumorstadium bei Patienten mit einer BCG-Therapie (Zlotta et al. 1999) noch zur Rezidivität im Vergleich zu Tumorstadium, Differenzierung, Tumorgröße und Multifokalität (Pfister et al. 1999). Die Bedeutung von p53 für Prognoseaussagen beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom ist somit nicht abschließend geklärt. Aus den eigenen mittels CGH ermittelten Daten ergibt sich kein Hinweis auf einen Zusammenhang eines Verlustes am Chromosom 17 mit der Rezidivität.

Edwards et al. ermittelten an pTa-Tumoren eine signifikante Korrelation von LOH 17q24-q25 mit einer erhöhten Rezidivität und verkürzten Rezidivzeit (Edwards et al. 2001), vermehrte Verluste an dieser Stelle konnten selbst nicht bestätigt werden.

Letztendlich erscheinen Gewinne am Chromosom 17 mit der Rezidivität von pTa-Tumoren in Verbindung zu stehen, wobei die molekularbiologischen Grundlagen noch nicht geklärt sind.

Ein Verlust des Chromosoms Y war mit 21 % bei nichtrezidivierenden und 32 % bei rezidivierenden Tumoren ein häufiges Ereignis. Dies wird auch in der Literatur beschrieben mit 28 % (pTa) bzw. 44 % (pT1) (Richter et al. 1997). Sandberg et al. berichteten über eine Korrelation von Y-Verlust und schlechter Prognose, wobei komplexe Chromosomenveränderungen vorhanden waren. Als Ursache des Y-Verlustes wurde ein erhöhter Turnover der Tumorzellen benannt. Andererseits gab es eine Anzahl Tumoren, welche Y-Verlust als einzige Aberration aufwiesen, diese waren meist nichtinvasiv und gut differenziert (Sandberg and Berger 1994). Neuhaus

et al. konnten keine Assoziation von Y-Verlust und Rezidivität oberflächlicher Tumoren pTa/1 herausstellen (Neuhaus et al. 1999). Aus den eigenen Daten erscheint das ebenfalls nicht möglich.

Verluste am Chromosom 11 waren bei 3 von 25 der nichtrezidivierenden und bei 6 von 28 der rezidivierenden Tumoren feststellbar. Dabei gab es je einmal Verlust vom gesamten Chromosom 11 sowie zwei- bzw. dreimal an 11p. Desweiteren verloren nur 3 rezidivierende Tumoren Teile von 11q: zwei Tumoren 11q14qter und ein Tumor 11q11q13.

Verluste am Chromosom 11 (LOH 11p) werden in der Literatur bei schlecht differenzierten (Olumi et al. 1990) bzw. invasiven Harnblasentumoren beschrieben, wobei auch schon in oberflächlichen Tumoren pTa/1 LOH 11p zu 35 % auftritt (Tsai et al. 1990; Habuchi et al. 1993). CGH-Untersuchungen ergaben 2 Verluste von 11p bei 20 pTa-Tumoren bzw. 1 Verlust an 11p und 2 Verluste an 11q bei 28 pTa-Tumoren (Richter et al. 1997; Simon et al. 1998). Diese Angaben sind vergleichbar mit den eigenen Ergebnissen.

Edwards et al. verglichen LOH auf den Chromosomen 4, 8, 11 und 17 mit der Rezidivität oberflächlicher Tumoren und ermittelten unter anderem eine signifikante Korrelation von LOH 11q23.3 mit der Rezidivität von pTa-Tumoren: 2 von 10 nicht-rezidivierende vs. 8 von 9 rezidivierende Tumoren ($p=0.001$) hatten diese Veränderung. Dabei war bei LOH 11q23.3 eine deutlich verkürzte Rezidivzeit nachweisbar (Edwards et al. 2001). Zwar sind diese Unterschiede bei den eigenen Tumoren nicht so eindeutig, einer von 25 nichtrezidivierenden Tumoren vs. 3 von 28 rezidivierenden Tumoren zeigten Verlust von 11q23.3, allerdings ist ein Trend erkennbar. Die 3 rezidivierenden Tumoren hatten eine durchschnittliche rezidivfreie Zeit von kleiner 12 Monaten, was für eine Beteiligung von 11q23.3 bei der Rezidivität von Harnblasentumoren sprechen könnte. Mögliche Kandidatengene sind das Onkogen Cbl (kodiert für ein Regulatorprotein von Tyrosinkinasen) und TSG11 (Tumorsuppressorgen auf Chromosom 11), deren Involvierung in die Tumorentstehung des Harnblasenkarzinoms und die Rezidivität aber noch nicht abschließend geklärt ist (Edwards et al. 2001). Shaw et al. grenzten bei LOH-Untersuchungen eine kleinste gemeinsame Region bei 11q13 und 11q23.3-q24 ein. Eine weitere Eingrenzung bei 29 von 30 Tumoren mit Verlust auf dem kurzen Arm

lag bei 11p15.5 und 11p15.1-15.2, das Onkogen HRAS und WT1 (Wilms-Tumor 1 Gen) waren nicht involviert (Shaw and Knowles 1995).

Vergleiche mit den Ergebnissen der FISH-Untersuchungen sind aufgrund der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden nur bedingt möglich. Mit FISH kann man nur einen Gewinn oder LOH an der Markerregion darstellen (wurde als Polysomie bzw. Monosomie benannt) aber zugleich auch Veränderungen in Subklonen nachweisen. Die CGH ist zum Screening aller Chromosomenabschnitte fähig und kann somit genaue Aberrationsbereiche eingrenzen.

Amplifikationen auf 11q13 werden häufig angegeben, auch in pTa-Tumoren (Proctor et al. 1991; Richter et al. 1997; Simon et al. 1998). Im eigenen Patientengut gab es eine Amplifikation von 11q13 sowie je einen Gewinn bei 11q13 bzw. 11q14 bei schnell rezidivierenden Tumoren mit einer durchschnittlichen rezidivfreien Zeit von kleiner als 12 Monaten. Bringuier et al. ermittelten bei 11 % eine Amplifikation von 11q13, wobei sie keine Korrelation zum Tumorgrad und -stadium feststellen konnten. Weiterhin wurde eine vermehrte Expression von Cyclin D1 und EMS1 (Cortactin), deren Gene auf 11q13 liegen, nachgewiesen (Bringuier et al. 1996).

Cyclin D1 aktiviert Cyclin-abhängige Kinasen, welche extra- und intrazelluläre Signale koordinieren und somit die Transition durch die verschiedenen Phasen des Zellzyklus bewirken. Eine Überexpression von Cyclin D1 kann die Zelle unter verstärkten Proliferationsdruck setzen (Wagener 1999). Blasentumoren können auch ohne Amplifikation von 11q13 eine Überexpression dieser zwei Gene aufweisen, was auf alternative Wege der Genaktivierung schließen läßt. Interessanterweise zeigten sich Niedrig-Level-Expressionen eher in aggressiveren Tumoren. Die Überexpression zumindest von Cyclin D1 wird nicht im Zusammenhang mit invasivem und metastatischem Wachstum, sondern proliferativem Wachstum gesehen (Bringuier et al. 1996). Shin et al. konnten dies bestätigen, sie fanden eine signifikante Korrelation zwischen Überexpression von Cyclin D1 und verkürzter rezidivfreier Zeit. Das Gesamtüberleben war dadurch nicht beeinflusst (Shin et al. 1997). Dies ist mit den Gewinnen auf 11q13 in den eigenen rezidivierenden Tumoren vergleichbar und spricht für eine spezifische Funktion für die Rezidiventstehung des papillären oberflächlichen nichtinvasiven Harnblasenkarzinoms.

Chromosom 10 zeigte in einem nichtrezidivierenden (4 %) und bei 5 rezidivierenden Harnblasentumoren (18 %) Verluste am langen Arm.

Verluste an Chromosom 10q werden im Gegensatz zu 10p bis zu 45 % in Harnblasenkarzinomen beschrieben (Cairns et al. 1998; Kagan et al. 1998). Es besteht eine Korrelation von Verlust an 10q zur Invasivität (12 % pTa/1-Tumoren vs. 58 % \geq pT2-Tumoren) und zur Entdifferenzierung (G1-Tumoren 0 %, G2-Tumoren 27 % und G3-Tumoren 62 %) (Cappellen et al. 1997).

In pTa- und pT1-Tumoren ließen sich solche Veränderungen in 4-5 % bzw. 18-31 % nachweisen (Richter et al. 1997; Simon et al. 1998), was mit den eigenen Daten vergleichbar ist (Gesamtverlust 11 %). Jedoch sind diese Verluste bei rezidivierenden Tumoren deutlich erhöht, was im Gegensatz zu den Ergebnissen von Bartlett et al. steht, welche keine Beziehung von Aneusomie 10 zur Rezidivität oberflächlicher Tumoren nachweisen konnten (Bartlett et al. 1999).

Bei den eigenen Tumoren mit Verlust an Chromosom 10 war die Region 10q24 bei allen Tumoren mitbetroffen. Cappellen et al. beschrieben in ihren Untersuchungen Verluste an der Region 10q24.1-q24.3. Dort ist als ein mögliches Tumorsuppressorgen Mxil beschrieben, ein negativer Regulator des myc-Onkogens (Cappellen et al. 1997).

Weitere Regionen potentieller Tumorsuppressorgene sind 10q26.1-q26.2 und 10q23.1-q23.3 (Kagan et al. 1998). Auf 10q23 befindet sich PTEN/ MMAC1 (Mutated in multiple advanced Cancers 1), ein Gegenregulator von Protein-Tyrosin-Kinasen. Dieses Gen wurde aber nur in 14 % aller Tumoren zusammen mit LOH 10q in mutierter oder inaktivierter Form gefunden, so daß andere Wege der Inaktivierung dieses Genes oder andere in der Nähe liegende Tumorsuppressorgene angenommen werden müssen (Cairns et al. 1998). LOH von 10q wird insgesamt eher mit Tumorprogression als mit Tumorinitiation in Verbindung gebracht. Jedoch sollte aufgrund der erhöhten Anzahl von Verlusten auf 10q24 bei den eigenen rezidivierenden Tumoren an eine Beteiligung eines dort gelegenen Tumorsuppressorgenes bezüglich einer erhöhten Rezidivität auch oberflächlicher Tumoren gedacht werden.

Die am häufigsten beim Harnblasenkarzinom beobachteten Chromosomenveränderungen sind Verluste am Chromosom 9 in 48-95.5 % (Olumi et al. 1990; Tsai et al. 1990; Baud et al. 1998; Simoneau et al. 1999). Das deckt sich mit den eigenen

Ergebnissen, die Gesamtverluste bei den nichtrezidivierenden und rezidivierenden Tumoren von 52 % bzw. 68 % zeigten. Dabei gab es 28 % bzw. 21 % Monosomien, 24 % bzw. 39 % Verluste an 9q und 0 bzw. 11 % Verluste an 9p.

Eine genaue LOH-Analyse am Chromosom 9 mittels 28 Satellitenmarkern führten Simoneau et al. an 139 pTa/1-Tumoren durch. Sie ermittelten 4 % Monosomien sowie 4 % LOH an 9p, 25 % LOH an 9q und 15 % LOH an 9p/q (Simoneau et al. 1999). Deutlich mehr Verluste beschrieben Baud et al. bei Tumoren verschiedenen Stadiums: 32 % Monosomie 9 sowie 64 % partielle Deletionen 9p und/ oder 9q (Baud et al. 1998). Dabei ist LOH 9q bzw. Monosomie 9 statistisch unabhängig von Tumorgrad und/ oder –stadium nachweisbar (Olumi et al. 1990; Waldman et al. 1991; Habuchi et al. 1993; Bartlett et al. 1998).

Der höhere Monosomieanteil der eigenen Tumoren im Gegensatz zu Simoneau et al. (Simoneau et al. 1999) könnte untersuchungsbedingt sein, da van Tilborg et al. bei einem Vergleich von ISH (In situ Hybridisierung) und LOH auch nur eine komplette Monosomie von Chromosom 9 bei einem von 40 Tumoren fanden. Dafür hatten 4 von 40 Tumoren Monosomiesubpopulationen von 23-40 % der Zellen (Van Tilborg et al. 1998).

In den CGH-Untersuchungen von Richter et al. wurden 57 % Gesamtverluste an Chromosom 9, darunter 35,7 % Monosomie 9, 17,9 % Verlust von 9q und 3,6 % Verlust von 9p ermittelt (Richter et al. 1997). Bei Simon et al. sind ähnliche Ergebnisse mit Gesamtverlusten von 55 % bei einer Monosomierate von 35 % des Chromosom 9 beschrieben (Simon et al. 1998). Im Vergleich mit den eigenen Daten ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Auffallend ist, daß bei den eigenen Tumoren wie auch bei Richter et al. (Richter et al. 1997) und Simoneau et al. (Simoneau et al. 1999) 9q deutlich mehr alteriert war als 9p. Dies deckt sich mit den Ausführungen anderer Autoren, welche einen Verlust von 9q für ein frühes Ereignis in der Blasentumorgenese halten (Simoneau et al. 1996), während ein Verlust von 9p eher bei invasiven Tumoren gesehen wird (Hafner et al. 2001; Kimura et al. 2001).

Hartmann et al. ermittelten allerdings bei oberflächlichen rezidivierenden Tumoren von 10 Patienten Verluste an 9p21 zu 90 % und 9q zu 69 %, was deutlich von den obengenannten Zahlen differiert (Hartmann et al. 2000). Auch hier wurden andere Untersuchungstechniken eingesetzt, die zu abweichenden Ergebnissen führen können.

Bei der Betrachtung einer Beteiligung von Chromosom 9 an der Rezidivität ist im eigenen Untersuchungsgut kein signifikanter Unterschied zwischen nichtrezidivierenden und rezidivierenden Tumoren zu Tage getreten. Es ist nur ein diskreter Anstieg der Verluste an Chromosom 9q von 24 % auf 39 % sowie bei 9p von 0 auf 11 % zu verzeichnen, die monosome Fraktion blieb konstant. Diese Ergebnisse werden durch Kimura et al. bestätigt, es war keine Korrelation von LOH 9q im Vergleich zu Tumorstadium, Grad, Rezidivität und Progreß auch bei oberflächlichen Tumoren nachzuweisen (Kimura et al. 2001). Während Pycha et al. in Untersuchungen mit FISH ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen rezidivierenden und nichtrezidivierenden Tumoren bezüglich Monosomie 9 feststellten (71-100 %) (Pycha et al. 1997), konnten Bartlett et al. eine signifikante Assoziation einer Monosomie an Chromosom 9 und Rezidivität herstellen, 5 % bei nicht- und 36 % bei rezidivierenden Tumoren (Bartlett et al. 1998; Bartlett et al. 1999). Edwards et al. ermittelten bei LOH-Untersuchungen an beiden Chromosomenarmen ebenfalls ein deutlich erhöhtes rezidivfreies Intervall, wenn nicht das ganze Chromosom verloren ging (Edwards et al. 2002).

Die deutliche Differenz zu den oben genannten Ergebnissen ist wahrscheinlich den unterschiedlichen Untersuchungsmethoden geschuldet. So wiesen van Tilborg et al. nach, daß die in der ISH ermittelte relative Unterrepräsentation des Chromosom 9 (Monosomie) bei 12 von 15 auswertbaren Tumoren mittels Mikrosatellitenanalyse nicht bestätigt werden konnte (Van Tilborg et al. 1998). In einem Vergleich von CGH, LOH und FISH konnten Obermann et al. jedoch eine recht gute Korrelation der Ergebnisse ermitteln. Es wurden allerdings in der FISH keine zentromernahen Regionen als Monosomiereferenz, sondern 9p21 und 9q22 untersucht. Die Ergebnisse der LOH und FISH an je 10 Hyperplasien und Tumoren korrelierten gut, nur in 2 Fällen konnte die Mikrosatellitenanalyse einen Verlust an 9q21 nicht nachvollziehen. Bei einem Vergleich von CGH und FISH kam es bei 3 von 10 Hyperplasien bzw. 2 von 10 Tumoren zu Diskrepanzen. Alle mittels CGH ermittelten Verluste am Chromosom 9 konnten jedoch bis auf eine Ausnahme durch FISH und LOH ermittelt werden. Fehlermöglichkeiten bei der CGH und LOH werden in einer Kontamination durch normales Gewebe gesehen (Obermann et al. 2003). Somit ist ein direkter Vergleich der durch unterschiedliche Analysemethoden ermittelten Ergebnisse kritisch zu sehen.

Auf dem langen Arm vom Chromosom 9 werden Tumorsuppressorgene vermutet, deren Verlust als ein frühes Ereignis für die Entstehung des Harnblasenkarzinoms fungieren könnte. In Untersuchungen werden als mögliche Regionen für Tumorsuppressorgene 9p12-9q21, 9q13-31, 9q22.3, 9q31, 9q33 und 9q34 angenommen (Habuchi et al. 1995; Simoneau et al. 1996; Simoneau et al. 1999). Single-Strand-Conformation-Polymorphismus-Analysen ergaben Mutationen in Tumoren mit LOH 9q34 im verbliebenen Tuberous-Sklerose-Gen TSC1, dieses könnte als ein mögliches Tumorsuppressorgen angesehen werden (Knowles 1999b).

Ein Tumorsuppressorgen auf 9q32-33 in der Region DBC1 (deleted in bladder cancer gene 1) könnte DBCCR1 (deleted in bladder cancer candidate region gene 1) sein. Bei 5 oberflächlichen gut differenzierten Harnblasenkarzinomen konnten kleine intersitielle Deletionen auf D9S195 nachgewiesen werden. Weiterhin traten bei 40 Blasenkarzinomen keine somatischen Mutationen, jedoch aber Hypermethylierungen in den 5'-CpG-Islands auf, welche zu einer Inaktivierung der Genprodukte bei LOH führen können. (Habuchi et al. 1997; Habuchi et al. 1998).

Van Tilborg et al. beschrieben eine interstitielle Deletion zwischen D9S275 und D9S1826. Diese Region tangiert die oben beschriebenen Gene DBC1 und TSC1. Eine weitere Deletion lag zwischen D9S165 und D9S176, welche die Ergebnisse von Habuchi e.a. (Habuchi et al. 1995) bestätigt (entspricht der Region 9q13-31) (van Tilborg et al. 1999).

Im eigenen Patientengut zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der meist betroffenen Regionen. Bei den nichtrezidivierenden Karzinomen gab es Verluste an 9q31 bei 13 von 13, 9q22qter bei 12 von 13 und 9q21qter bei 11 von 13 Tumoren. Die rezidivierenden Karzinome hatten Verluste von 9q32 bei 17 von 17, 9q21q33 bei 16 von 17 und 9q21qter bei 15 von 17 Tumoren.

Edwards et al. ermittelten für LOH der TSC1-Region allein wie auch in Verbindung mit LOH von INK4A und DBC1 eine deutliche Assoziation zur Rezidivität bei pTa-Tumoren. Für LOH 9q32-33 bzw. 9p21 allein galt dieser Zusammenhang allerdings nicht (Edwards et al. 2002). Kimura et al. konnten dies für keine dieser Regionen bestätigen (Kimura et al. 2001). In der eigenen Untersuchung war eine Zuordnung einer spezifischen Region auf Chromosom 9 zu einer möglichen Rezidivität nicht möglich.

Eine Alteration von 9p trat in unserer Untersuchung weniger häufig als eine von 9q auf. Es wurde aber ein deutlich erhöhtes Rezidivrisiko von 1,95 oberflächlicher Tumoren mit einer homozygoten Deletion des auf 9p21 gelegenen INK4A-Genes beschrieben. Folge ist eine Inaktivierung von 16p und 19^{ARF} mit möglicher Deregulierung des Zellzyklus als Folge. Dabei waren immer das INK4A-Exon 1beta und INK4B mitbetroffen (Orlow et al. 1999). Andere Untersucher mit geringeren Patientenzahlen konnten keinen Zusammenhang von LOH 9p21 bzw. p16-Expression und Rezidivität oberflächlicher Tumoren erkennen (Friedrich et al. 2001; Edwards et al. 2002). Weiterhin ist eine Inaktivierung des Genes über Methylierung der p16-Promotorregion bekannt, wobei diese wie die homozygote Deletion von INK4A mit einem negativen p16-Phänotyp assoziiert war (Akao et al. 1997; Orlow et al. 1999). Solche Veränderungen im subchromosomalen Bereich können mit CGH nicht dargestellt werden, allerdings könnten sie durchaus bei der Rezidivität eine Rolle spielen.

Insgesamt erscheint eine Deletion des Chromosom 9 und im speziellen des 9q ein frühes Ereignis in der Tumorgenese der Blasentumoren zu sein. Allerdings konnten van Tilborg et al. bei multilokulären und/ oder Rezidivtumoren eines Patienten bis zu 10 unterschiedliche LOH-Regionen auf 9q eingrenzen. Auch die Variabilität zwischen den Patienten war sehr groß, so daß mittels LOH keine Region ermittelt werden konnte, welche verdächtig auf ein Tumorsuppressorgen mit Wirkung auf die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms wäre (van Tilborg et al. 2002). Inwieweit ein auf 9q gelegenes Tumorsuppressorgen dafür und für die häufige Rezidivität verantwortlich ist oder der partielle bzw. ganze Verlust dieses Chromosomes eher ein allgemeines Zeichen genetischer Instabilität ist, bleibt zu klären.

Zusammenfassend sind Verluste an 10q und 11q, Gewinne an Chromosom 17 und Gewinne bzw. Amplifikationen von 11q13/ 11q14 bei rezidivierenden Tumoren erhöht, was für eine mögliche Bedeutung dieser Veränderungen bei der Rezidivität oberflächlicher Blasentumoren spricht. Allerdings konnten Zhao et al. anhand 113 pTa-Tumoren mittels CGH keine Korrelation von chromosomalen Veränderungen zur Rezidivität ermitteln (Zhao et al. 1999). Unklar erscheint die Wertigkeit der Gewinne von Chromosom 7 und 15 bei nichtrezidivierenden Tumoren. Weitere Untersuchungen, auch mit anderen Untersuchungsmethoden, sollten folgen.

6.4. Chromosomale Veränderungen in Bezug auf die durchschnittliche rezidivfreie Zeit

Wie bereits oben im ersten Diskussionsabschnitt dargestellt, zeigten multifokale Tumoren eine deutlich höhere Rezidivität und ein verringertes rezidivfreies Intervall als monofokale Tumoren. Dabei hat die Zeitdauer bis zum ersten Rezidiv eine große prognostische Bedeutung. Bei Rezidiven innerhalb von 3 Monaten nach Erstresektion erhöht sich das Risiko eines erneuten Rezidives von 20 % auf 70 bis 85 % (Lutzeyer et al. 1982; Fitzpatrick et al. 1986). Für die Untersuchung typischer Veränderungen hinsichtlich der durchschnittlichen rezidivfreien Zeit wurden die Patienten in 4 Gruppen eingeteilt. Dabei zeigte sich, daß mit abnehmendem rezidivfreien Intervall die Anzahl der Chromosomenveränderungen im Primärtumor deutlich größer wird. Sie steigt von gesamt 1,4 Aberrationen bei Tumoren mit einer durchschnittlichen rezidivfreien Zeit von mehr als 24 Monaten auf 3,6 Aberrationen bei Tumoren mit Zeiten bis zu 6 Monaten an. Das Verhältnis von Verlusten und Gewinnen ist jeweils etwa gleich. Schnell rezidivierende Tumoren scheinen demzufolge mehr chromosomale Veränderungen zu akkumulieren, was zu einer erhöhten genetischen Instabilität und letztlich aggressiverem Tumorwachstum führen kann.

Die auffälligsten Befunde waren Verluste am Chromosom 11 und Gewinne am Chromosom 17 mit je 44 % bei einer rezidivfreien Zeit bis zu 6 Monaten, welche mindestens doppelt so hoch wie die anderer Gruppen waren. Für LOH am 11q ist dies von Edwards et al. schon beschrieben worden (Edwards et al. 2001).

Weitere Veränderungen betrafen Gewinne der Chromosomen 1 und 11.

Diese Befunde scheinen in einem direkten Zusammenhang zu einer deutlich verkürzten Rezidivzeit zu stehen. Gewinne am Chromosom 11 kamen in der vorliegenden Chromosomenanalyse nur bei schnell rezidivierenden Tumoren vor. Die durchschnittliche rezidivfreie Zeit dieser Tumoren lag bei 2, 6 und 7 Monaten. Ein mögliches Target auf 11q13 ist Cyclin D1, welches bei nichtinvasiven Tumoren überexprimiert (Bringuier et al. 1996) und dabei mit einem deutlich verkürzten Rezidivintervall assoziiert ist (Shin et al. 1997).

Die deutlich erhöhten Aberrationszahlen und die oben beschriebenen Chromosomenveränderungen erscheinen richtungsweisend, so daß sie bei der Bewertung des zeitlichen Rezidivrisikos eine Rolle spielen könnten.

6.5. Chromosomale Veränderungen hinsichtlich der Anzahl der Primärtumoren - Multifokalität

In der Literatur wird der Zusammenhang zwischen Multifokalität der Harnblasenkarzinome und einer erhöhten Rezidivität bzw. einem verkürzten rezidivfreien Intervall beschrieben (Heney et al. 1983; Parmar et al. 1989; Kurth et al. 1992). Auch bei den eigenen Tumoren konnte dieser Zusammenhang ermittelt werden.

Die Entstehung multifokaler Tumoren wird mit 2 verschiedenen Theorien beschrieben. Beim „field defect“ werden die Zellen des gesamten Urothels durch Karzinogene genetisch geschädigt, über Transformationsvorgänge können syn- und metachrone Tumoren entstehen (Harris and Neal 1992). Die Urothelkarzinome stellen per se eine sehr heterogene Tumorentität dar, welche durch verschiedene Chromosomenaberrationen charakterisiert sein können. Somit sind bei unabhängig voneinander entstehenden Tumoren eines Patienten auch variable genetische Veränderungen zu erwarten.

Die andere Möglichkeit ist die Entstehung der Multifokalität durch eine monoklonale Aussaat der Tumoren (Habuchi et al. 1993; Miyao et al. 1993), wobei mehr als 80% der oberflächlichen Tumoren diesen Entstehungsweg nehmen sollen (Takahashi et al. 1998). Die Zellen der Primärtumoren müßten die Fähigkeit zur intraepithelialen Migration bzw. Anheftung an das Urothel bei intraluminaler Verbreitung haben. Dies setzt aber spezielle molekulare Veränderungen voraus wie Onkogenexpression oder Verlust der Expression von Tumorsuppressorgenen, welche durch Chromosomenalterationen entstehen können.

Die Primärveränderungen des Ursprungsklons werden an die nachfolgenden Subklone weitergegeben (Sidransky et al. 1992; Takahashi et al. 1998; Hartmann et al. 2000). Diese Subklone können weitere genetische Schäden anhäufen und zeitlich voneinander unabhängig klinisch in Erscheinung treten.

Dies hat zur Folge, daß verschiedene resezierte Tumoren eines Patienten unterschiedliche Chromosomenaberrationen aufweisen. Andererseits können entsprechend der klonalen Entwicklungstheorie gemeinsame chromosomale Veränderungen bei allen Tumoren nachgewiesen werden, welche vom Ursprungs- klon stammen (van Tilborg et al. 2000). Ein Ziel dieser Arbeit war es, die genetischen Primärveränderungen herauszufinden, welche zu einem multifokalen Tumorentstehungsfaktor führen können.

Diese Überlegungen ließen einen gewissen Unterschied zwischen mono- und multifokalen Tumoren erwarten. Die Aberrationsrate war bei letzteren moderat höher: 2,30 vs. 2,82 pro Tumor.

Die multifokalen Tumoren zeigten im Gegensatz zu den monofokalen vermehrt Gewinne am Chromosom 1 (18,2 % vs. 3,7 %) sowie Verluste an den Chromosomen 8p (13,6 % vs. 0 %), 10q (18,2 % vs. 7,4 %) und 11 (22,7 % vs. 14,8 %).

Diese Veränderungen treten neben anderen Chromosomenveränderungen im Vergleich zu pTa-Tumoren deutlich vermehrt in pT1-Tumoren auf. Die pT1-Tumoren gelten aufgrund der erhöhten Gesamtanzahl von Aberrationen als genetisch instabil. Die oben genannten Chromosomen werden unter anderem als mögliche Träger von Genen benannt, welche bei der Invasion der Harnblasenkarzinome eine Rolle spielen könnten (Richter et al. 1997; Simon et al. 1998). Zhao et al. beschrieben ebenso einen signifikant höheren Verlust von 8p und 10q bei G3pTa- gegenüber G2pTa-Tumoren. Der Verlust von 11p/q und Gewinn von 1q war zwar erhöht, erreichte aber kein Signifikanzniveau (Zhao et al. 1999). Der Einfluß der histologischen Differenzierung und des Tumorstadiums auf die Rezidivhäufigkeit oberflächlicher Tumoren wird unterschiedlich beschrieben (Di Silverio et al. 1992; Kurth et al. 1992; Neuhaus et al. 1999). Jedoch kann man aus den eigenen Daten auf einen möglichen Zusammenhang von Rezidivität und Verlusten von 10q und Chromosom 11 schließen, die bei multilokulären und rezidivierenden Tumoren gleichsam deutlich häufiger alteriert waren. Die entsprechenden Ausführungen zur Beteiligung dieser Chromosomen wurden im Abschnitt 5.3. abgehandelt. Es sei dabei noch einmal auf den Zusammenhang von multifokalem Tumorwachstum und einer erhöhten Rezidivität hingewiesen (Heney et al. 1983; Parmar et al. 1989; Kurth et al. 1992).

Auf die Rezidivität scheinen Gewinn von 1q und Verlust von 8p keinen Einfluß zu haben, da sie im Vergleich rezidivierender mit nichtrezidivierenden Tumoren keine größeren Unterschiede im Aberrationsverhalten zeigten. Eher scheinen sie eine Rolle bei der Invasivität oberflächlicher Tumoren zu spielen. Diese Annahme wird durch die Untersuchung von Watters et al. gestützt, welche eine signifikante Assoziation zwischen Polysomie des Chromosoms 1 und der Progression rezidivierender pTa/1-Tumoren zeigte. Ein Zusammenhang zur Rezidivität dieser Tumoren stellte sich nicht dar (Watters et al. 2002). Allerdings beschrieben Neuhaus et al. eine signifikante Assoziation von Polysomie des Chromosom 1 bei Rezidiv-

tumoren (Neuhaus et al. 1999). Inwieweit das auf 1q23-24 gelegene Gen KIAA 1096, welches bei pTa/1-Tumoren zu 20 % überexprimiert und 27 % amplifiziert ist, eine Rolle spielt, ist unklar (Huang et al. 2002). Der Verlust von 8p wird mit invasiven und metastasierenden Tumoren in Verbindung gebracht (Ohgaki et al. 1999).

Weitere Veränderungen sind Gewinne am Chromosom 7, welche allesamt bei monofokalen Tumoren auftraten. Bei Chromosom 7 wird Polysomie mit Rezidivität und Invasivität in Verbindung gebracht. Die Diskrepanz ist möglicherweise durch die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden verursacht, da FISH-Untersuchungen differente Ergebnisse im Vergleich zur CGH erbringen können. Zudem konnten andere Autoren mittels CGH an pTa/1-Tumoren ebenfalls Gewinne am Chromosom 7 von 0 % bis 15 % nachweisen, die von den bis zu 61 % Polysomie von Chromosom 7 bei FISH-Untersuchungen deutlich abwichen (Pycha et al. 1997; Richter et al. 1997; Simon et al. 1998; Bartlett et al. 1999; Zhao et al. 1999; Watters et al. 2000). Allerdings sind mit der CGH Veränderungen kleiner als 10 Mb bzw. balanzierte Veränderungen wie Translokation und Polysomie des gesamten Genoms nicht detektierbar, so daß entsprechende Genveränderungen nicht erkannt werden könnten.

Die Gewinne am Chromosom 17 bzw. 17q waren mit 18,5 % bei monofokalen Tumoren etwa gleich häufig vertreten wie in multifokalen Tumoren mit 13,6 %. In der Literatur wird von einer Assoziation einer Polysomie von Chromosom 17 mit Rezidivität und Invasion von pTa-Tumoren berichtet (Bartlett et al. 1999; Neuhaus et al. 1999; Watters et al. 2000). Auch war ein Gewinn von 17 bzw. 17q in den eigenen Untersuchungen deutlich assoziiert mit Rezidivität und verkürztem rezidivfreien Intervallen. Es rezidierten aber auch monofokale Tumoren, wobei dies durch Residualtumoren oder kleine bei Resektion nicht sichtbare Tumoren bedingt sein könnte. Somit können natürlich ebenso entsprechende Chromosomenveränderungen in monofokalen Tumoren auftreten. Durch die PDD-Diagnostik kann die Rezidivität signifikant gesenkt werden (Filbeck et al. 2003). Die Resektion der eigenen untersuchten Tumoren erfolgte nur unter Weißlicht, so daß bei der Erstresektion der primär monofokalen Tumoren kleine Tumorherde unerkannt in situ verblieben sein könnten und die Monofokalität mancher Tumoren vorgetäuscht war.

6.6. Chromosomale Veränderungen abhängig vom Differenzierungsgrad

Überraschenderweise hatten G1-Tumoren eine gering höhere Gesamtaberrationszahl von 2,80 als G2-Tumoren mit 2,39 pro Tumor. Diese ohnehin nicht signifikanten Unterschiede sind sicher auf die geringe Fallzahl der G2-Tumoren zurückzuführen.

Andere Autoren beschreiben eine erhöhte Anzahl von Aberrationen bei höhergradigen Tumoren. Bei pTa/1-Tumoren konnten Richter et al. einen Anstieg der Chromosomenveränderungen von 1,3 (G1-Tumoren) auf 3,6 (G2-Tumoren) nachweisen (Richter et al. 1997). Diese Zahlen bestätigten Zhao et al. an pTa-Tumoren (1,9 vs. 3,1 pro Tumor), wobei die G3-Tumoren mit 7,7 Aberrationen sich deutlich abheben (Zhao et al. 1999).

Eine weitere Erklärung könnte die spezifische Verteilung der Aberrationen sein. Auffallend ist dabei, daß bei gut differenzierten Tumoren das Chromosom 9 deutlich häufiger Verluste zeigt als bei mäßig differenzierten Tumoren, insgesamt 69 % vs. 44 %, wobei 9q mit 40 % vs. 17 % hervorsticht. Die Monosomie ist mit 22 % vs. 28 % etwa gleich. Interessant diesbezüglich ist, daß Richter et al. bei den aggressiveren pT1-Tumoren im Gegensatz zu pTa-Tumoren ebenfalls einen verminderten Verlust von Chromosom 9 gesehen haben. Die pT1-Tumoren hatten allerdings eine deutlich größere Gesamtaberrationszahl (Richter et al. 1997). Weiterhin beschrieben andere Autoren keine Korrelation von Verlust des Chromosoms 9 und Differenzierung (Olumi et al. 1990; Waldman et al. 1991; Habuchi et al. 1993; Bartlett et al. 1998).

Bei einigen Chromosomen gab es im Vergleich von G1- zu G2-Tumoren gewisse Unterschiede: Gewinne an dem Chromosom 1 zu 9 % bzw. 17 % und Chromosom 17 zu 23 % bzw. 11 % sowie Verluste an 10q mit 9 % bzw. 17 %, Chromosom 11 mit 14 % bzw. 28 % und Chromosom Y mit 31 % bzw. 11 %.

Über die mögliche Mitwirkung dieser Chromosomen bei der Tumorentstehung sind im obenstehenden Abschnitt 5.3. der Diskussion schon Ausführungen erfolgt.

Interessant ist jedoch die Beobachtung von Zhao et al., welche eine deutliche Zunahme von Gewinnen an 7q und 17q bei mittelgradig differenzierten im Vergleich zu gut differenzierten Tumoren nachwiesen, die möglicherweise eine Rolle bei der Entdifferenzierung der Tumoren spielen können (Zhao et al. 1999).

Carbin et al. zeigten bei einer Differenzierung von G2-Tumoren in G2a- und G2b-Untergruppen, daß deutliche Unterschiede im biologischen Verhalten auftraten. Das Progreßrisiko der G2a-Gruppe betrug 8 % gegenüber 57 % der G2b-Gruppe (Carbin

et al. 1991). Man kann also vermuten, daß mittelgradig differenzierte Tumoren eine inkohärente Tumorentität sind, welche sich über unterschiedliche Wege entwickeln und ein unterschiedliches biologisches Verhalten zeigen können, was sich auch in verschiedenen Chromosomenaberrationen zeigen könnte.

6.7. Geschlechtsspezifische Unterschiede chromosomaler Aberrationen

Es gab bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung der CGH-Resultate einige Unterschiede. Tumoren der weiblichen Patienten waren zu 60 % mittelgradig differenziert im Gegensatz zu denen männlicher Patienten mit 24 %. Zugleich war die durchschnittliche Aberrationszahl mit 3,13 deutlich höher als die bei Tumoren männlicher Patienten mit 2,47, welche der oben genannten niedrigeren Aberrationszahl bei mäßig differenzierten Tumoren entspricht. Diese höhere Zahl kommt aber nur durch mehr chromosomale Gewinne (1,47 vs. 0,79) zustande, Verluste sind in beiden Gruppen gleich (1,67 bzw. 1,68). Spricht dies nun für eine generell erhöhte Aggressivität von Blasentumoren weiblicher Patienten? Puente et al. untersuchten geschlechtsspezifische klinische und pathologische Merkmale von Blasentumoren und kamen zu dem Ergebnis, daß Frauen zum Zeitpunkt der Diagnostik geringfügig mehr oberflächliche Tumoren als Männer hatten sowie zu einem deutlich erhöhten Prozentsatz multilokuläre und größere Tumoren aufwiesen. Allerdings können verschiedene Einflußgrößen verfälschend auf solche Unterschiede wirken. Möglich ist eine verzögerte Diagnosestellung einer Hämaturie bei Frauen (Puente et al. 2003), was zu einem fortgeschrittenerem Tumorstadium mit Entdifferenzierung und größerer genetischer Instabilität führen kann. Ein großer Unterschied zeigte sich bei Chromosom 10, nur 5 % Verlust bei Männern standen 27 % bei Frauen gegenüber. Eine Korrelation dieser Veränderung zur Entdifferenzierung und Invasivität ist beschrieben (Cappellen et al. 1997). Inwieweit dies frauenspezifisch ist oder obengenannter Problematik angelastet werden kann bedarf weiterer Untersuchungen.

7. **Schlußfolgerungen**

Wie in der Literatur beschrieben hatten multifokale Tumoren im Vergleich zu monofokalen Tumoren ein höheres Risiko zu rezidivieren sowie eine deutlich verkürzte rezidivfreie Zeit. Morphometrische Beschreibungen der Tumoren wie Anzahl, Differenzierung, Tumorgroße und vorheriges Rezidiv sind jedoch nicht ausreichend, um ein exaktes Rezidivrisiko vorauszusagen.

In der vorliegenden Arbeit konnten durch die CGH folgende Chromosomenveränderungen der pTa-Tumoren ermittelt werden: Gewinne an den Chromosomen 1, 7, 8, 13 und 17 sowie Verluste von den Chromosomen 9, 10, 11, 18 und Y. Dies entspricht den Daten aus anderen Publikationen.

Die Anzahl der Gesamtaberrationen war unabhängig von der Rezidivität, was für die genetische Stabilität auch rezidivierender pTa-Tumoren spricht mit nur geringem Risiko des Progresses. Jedoch konnten bei rezidivierenden Tumoren vermehrt Verluste am Chromosom 11 und von 10q sowie Gewinne am Chromosom 17 und von 11q13 bzw. 11q14 nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang des Verlustes von Chromosom 11 und des Gewinnes von Chromosom 17 bzw. 11q13/ 11q14 mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben. Somit scheinen diese Chromosomenveränderungen bei der Rezidivität der Harnblasentumoren eine Rolle zu spielen. Auffällig ist auch, daß die rezidivierenden Tumoren mit einer höheren Akkumulation von Aberrationen ein deutlich verkürztes rezidivfreies Intervall hatten.

Die Multifokalität der Harnblasenkarzinome wird anhand der monoklonalen Entstehungstheorie erklärt, nach der alle Tumoren aus einem Ausgangsklon hervorgehen. Zwar verändern sich die daraus entstehenden Subklone genetisch weiter, die Primärveränderungen sind jedoch in den Rezidivtumoren nachweisbar. Im Vergleich zu monofokalen zeigten multifokale Tumoren deutlich mehr Aberrationen an den Chromosomen 1 und 11 bzw. 8p und 10q, wobei die Veränderungen an den Chromosomen 10 und 11 für die erhöhte Rezidivität multifokaler Tumoren verantwortlich zu sein scheinen.

Die Ergebnisse beim Chromosom 7 sind unklar, da ein Gewinn eher bei monofokalen und nichtrezidivierenden Tumoren auftrat. Die Differenzen zu den Daten aus der Literatur sind möglicherweise unterschiedlichen Untersuchungstechniken geschuldet.

Weiterhin kann es durch CGH nicht detektierbare Veränderungen geben, welche für Rezidivität bzw. Multifokalität typisch sind.

Während die gut differenzierten Tumoren vermehrt Gewinne am Chromosom 17 und Verluste von 9q ausbildeten, waren bei den geringer differenzierten Tumoren mehr Gewinne am Chromosom 1 und Verluste an den Chromosomen 10 und 11 nachweisbar. Dies spricht für eine Ausprägung spezieller genetischer Veränderungen im Verlauf der Entdifferenzierung der Tumoren.

Die bei weiblichen Patienten ermittelte größere Aberrationszahl, schlechtere Differenzierung und vor allem der vermehrte Verlust von 10q spricht dafür, daß Frauen primär aggressivere Tumoren entwickeln. Eine andere Ursache könnte eine geschlechtsspezifisch bedingt verzögerte Diagnostik sein.

Es konnten mittels CGH Chromosomenveränderungen (Verlust 10q und 11, Gewinn 17 und 11q13/ 11q14) in Relation zur Rezidivität und rezidivfreiem Überleben nachgewiesen werden. Die genauen molekularen und genetischen Hintergründe sind noch nicht ermittelt. Deshalb sollten diese Chromosomenabschnitte mit anderen Untersuchungsmethoden (z.B. Mikrosatelliten) weiteruntersucht werden.

Literatur- und Quellenverzeichnis:

- Adshead, J. M., A. M. Kessling and C. W. Ogden (1998). "Genetic initiation, progression and prognostic markers in transitional cell carcinoma of the bladder: a summary of the structural and transcriptional changes, and the role of developmental genes." *Br J Urol* 82(4): 503-12.
- Akao, T., Y. Kakehi, N. Itoh, E. Ozdemir, T. Shimizu, A. Tachibana, M. S. Sasaki and O. Yoshida (1997). "A high prevalence of functional inactivation by methylation modification of p16INK4A/CDKN2/MTS1 gene in primary urothelial cancers." *Jpn J Cancer Res* 88(11): 1078-86.
- Annual Cancer Statistics Review: Including cancer trends: 1950-1985 (1987). Bethesda, National Cancer Institute, U.S. Department of Health and Human Services. NIH publication no. 88-2789.
- Banks, L., G. Matlashewski and L. Crawford (1986). "Isolation of human-p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression." *Eur J Biochem* 159(3): 529-34.
- Bartlett, J. M., L. Adie, A. D. Watters, J. J. Going and K. M. Grigor (1999). "Chromosomal aberrations in transitional cell carcinoma that are predictive of disease outcome are independent of polyploidy." *BJU Int* 84(7): 775-9.
- Bartlett, J. M., A. D. Watters, S. A. Ballantyne, J. J. Going, K. M. Grigor and T. G. Cooke (1998). "Is chromosome 9 loss a marker of disease recurrence in transitional cell carcinoma of the urinary bladder?" *Br J Cancer* 77(12): 2193-8.
- Bastacky, S., S. Ibrahim, S. P. Wilczynski and W. M. Murphy (1999). "The accuracy of urinary cytology in daily practice." *Cancer* 87(3): 118-28.

- Baud, E., P. Catilina, J. P. Boiteux and Y. J. Bignon (1998). "Human bladder cancers and normal bladder mucosa present the same hot spot of heterozygous chromosome-9 deletion." *Int J Cancer* 77(6): 821-4.
- Bell, D. A., J. A. Taylor, D. F. Paulson, C. N. Robertson, J. L. Mohler and G. W. Lucier (1993). "Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer." *J Natl Cancer Inst* 85(14): 1159-64.
- Böhle, A. and D. Jocham (1998). *Die intravesikale Immuntherapie mit Bacillus Calmette-Guerin. Fakten, Vergleiche, Ergebnisse.* Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, Gustav Fischer Verlag.
- Brauers, A., R. Buettner and G. Jakse (2001). "Second resection and prognosis of primary high risk superficial bladder cancer: is cystectomy often too early?" *J Urol* 165(3): 808-10.
- Brauers, A. and G. Jakse (1996). "Neue zytogenetische und molekularbiologische Parameter für die Entstehung und Prognose des Urothelkarzinoms." *Akt. Urol.* 27: 12-19.
- Bringuier, P. P., Y. Tamimi, E. Schuurin and J. Schalken (1996). "Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumours; relationship with chromosome 11q13 amplification." *Oncogene* 12(8): 1747-53.
- Bringuier, P. P., R. Umbas, H. E. Schaafsma, H. F. Karthaus, F. M. Debruyne and J. A. Schalken (1993). "Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors." *Cancer Res* 53(14): 3241-5.
- Brown, T. A. (1996). 11. *Die Polymerasekettenreaktion.* Heidelberg Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.
- Cairns, P., E. Evron, K. Okami, N. Halachmi, M. Esteller, J. G. Herman, S. Bose, S. I. Wang, R. Parsons and D. Sidransky (1998). "Point mutation and homozygous

deletion of PTEN/MMAC1 in primary bladder cancers." *Oncogene* 16(24): 3215-8.

Cairns, P., M. E. Shaw and M. A. Knowles (1993). "Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumour-suppressor gene on chromosome 9." *Oncogene* 8(4): 1083-5.

Cappellen, D., S. Gil Diez de Medina, D. Chopin, J. P. Thiery and F. Radvanyi (1997). "Frequent loss of heterozygosity on chromosome 10q in muscle-invasive transitional cell carcinomas of the bladder." *Oncogene* 14(25): 3059-66.

Carbin, B. E., P. Ekman, H. Gustafson, N. J. Christensen, B. Sandstedt and C. Silfversward (1991). "Grading of human urothelial carcinoma based on nuclear atypia and mitotic frequency. I. Histological description." *J Urol* 145(5): 968-71.

Catto, J. W., G. Xinarianos, J. L. Burton, M. Meuth and F. C. Hamdy (2003). "Differential expression of hMLH1 and hMSH2 is related to bladder cancer grade, stage and prognosis but not microsatellite instability." *Int J Cancer* 105(4): 484-90.

Chen, S. S., K. K. Chen, A. T. Lin, Y. H. Chang, H. H. Wu, T. H. Hsu and L. S. Chang (1996). "The significance of tumour grade in predicting disease progression in stage Ta transitional cell carcinoma of the urinary bladder." *Br J Urol* 78(2): 209-12.

Clavel, J., S. Cordier, L. Boccon-Gibod and D. Hemon (1989). "Tobacco and bladder cancer in males: increased risk for inhalers and smokers of black tobacco." *Int J Cancer* 44(4): 605-10.

Crew, J. P., T. O'Brien, R. Bicknell, S. Fuggle, D. Cranston and A. L. Harris (1999). "Urinary vascular endothelial growth factor and its correlation with bladder cancer recurrence rates." *J Urol* 161(3): 799-804.

- Cutler, S. J. and J. L. Young (1975). "Third national cancer survey: incidence data." Natl Cancer Inst Monogr 41: 1.
- Dalbagni, G., J. C. Presti, Jr., V. E. Reuter, Z. F. Zhang, A. S. Sarkis, W. R. Fair and C. Cordon-Cardo (1993). "Molecular genetic alterations of chromosome 17 and p53 nuclear overexpression in human bladder cancer." Diagn Mol Pathol 2(1): 4-13.
- Di Silverio, F., M. von Heland, E. De Berardinis, R. Izzi, M. Buscarini, R. De Vita, R. Forte, F. Seccareccia and A. Menotti (1992). "Prognostic role of flow cytometry in superficial bladder cancer." Eur Urol 21 Suppl 1: 22-5.
- Edwards, J., P. Duncan, J. J. Going, K. M. Grigor, A. D. Watters and J. M. Bartlett (2001). "Loss of heterozygosity on chromosomes 11 and 17 are markers of recurrence in TCC of the bladder." Br J Cancer 85(12): 1894-9.
- Edwards, J., P. Duncan, J. J. Going, A. D. Watters, K. M. Grigor and J. M. Bartlett (2002). "Identification of loci associated with putative recurrence genes in transitional cell carcinoma of the urinary bladder." J Pathol 196(4): 380-5.
- Filbeck, T., U. Pichlmeier, R. Knuechel, W. F. Wieland and W. Rossler (2003). "[Reducing the risk of superficial bladder cancer recurrence with 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis. Results of a 5-year study]." Urologe A 42(10): 1366-73.
- Fitzpatrick, J. M., A. B. West, M. R. Butler, V. Lane and J. D. O'Flynn (1986). "Superficial bladder tumors (stage pTa, grades 1 and 2): the importance of recurrence pattern following initial resection." J Urol 135(5): 920-2.
- Fontana, D., M. Bellina, C. Scoffone, E. Cagnazzi, S. Cappia, F. Cavallo, R. Russo and E. Leonardo (1996). "Evaluation of c-ras oncogene product (p21) in superficial bladder cancer." Eur Urol 29(4): 470-6.

- Friedrich, M. G., C. Blind, K. Milde-Langosch, A. Erbersdobler, S. Conrad, T. Loning, P. Hammerer and H. Huland (2001). "Frequent p16/MTS1 inactivation in early stages of urothelial carcinoma of the bladder is not associated with tumor recurrence." *Eur Urol* 40(5): 518-24.
- Gazzaniga P, G. A., Giuliani L, Gandini O, Silvestri I, Nofroni I, Saccani G, Frati L, Agliano AM. (2003). "Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer." *Ann Oncol.* 14(1): 85-90.
- Gontero, P., G. Casetta, A. Zitella, R. Ballario, D. Pacchioni, C. Magnani, G. H. Muir and A. Tizzani (2000). "Evaluation of P53 protein overexpression, Ki67 proliferative activity and mitotic index as markers of tumour recurrence in superficial transitional cell carcinoma of the bladder." *Eur Urol* 38(3): 287-96.
- Greenblatt, M. S., W. P. Bennett, M. Hollstein and C. C. Harris (1994). "Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis." *Cancer Res* 54(18): 4855-78.
- Habuchi, T., J. Devlin, P. A. Elder and M. A. Knowles (1995). "Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumour suppressor loci." *Oncogene* 11(8): 1671-4.
- Habuchi, T., M. Luscombe, P. A. Elder and M. A. Knowles (1998). "Structure and methylation-based silencing of a gene (DBCCR1) within a candidate bladder cancer tumor suppressor region at 9q32-q33." *Genomics* 48(3): 277-88.
- Habuchi, T., O. Ogawa, Y. Kakehi, K. Ogura, M. Koshiba, S. Hamazaki, R. Takahashi, T. Sugiyama and O. Yoshida (1993). "Accumulated allelic losses in the development of invasive urothelial cancer." *Int J Cancer* 53(4): 579-84.
- Habuchi, T., O. Yoshida and M. A. Knowles (1997). "A novel candidate tumour suppressor locus at 9q32-33 in bladder cancer: localization of the candidate region within a single 840 kb YAC." *Hum Mol Genet* 6(6): 913-9.

- Hafner, C., R. Knuechel, L. Zanardo, W. Dietmaier, H. Blaszyk, J. Cheville, F. Hofstaedter and A. Hartmann (2001). "Evidence for oligoclonality and tumor spread by intraluminal seeding in multifocal urothelial carcinomas of the upper and lower urinary tract." *Oncogene* 20(35): 4910-5.
- Harris, A. L. and D. E. Neal (1992). "Bladder cancer--field versus clonal origin." *N Engl J Med* 326(11): 759-61.
- Hartmann, A., U. Rosner, G. Schlake, W. Dietmaier, D. Zaak, F. Hofstaedter and R. Knuechel (2000). "Clonality and genetic divergence in multifocal low-grade superficial urothelial carcinoma as determined by chromosome 9 and p53 deletion analysis." *Lab Invest* 80(5): 709-18.
- Hartmann, A., G. Schlake, D. Zaak, E. Hungerhuber, A. Hofstetter, F. Hofstaedter and R. Knuechel (2002). "Occurrence of chromosome 9 and p53 alterations in multifocal dysplasia and carcinoma in situ of human urinary bladder." *Cancer Res* 62(3): 809-18.
- Hasui, Y., K. Marutsuka, Y. Asada and Y. Osada (1996). "Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in patients with superficial bladder cancer." *Urology* 47(1): 34-7.
- Hasui, Y., K. Marutsuka, S. Nishi, S. Kitada, Y. Osada and A. Sumiyoshi (1994). "The content of urokinase-type plasminogen activator and tumor recurrence in superficial bladder cancer." *J Urol* 151(1): 16-9; discussion 19-20.
- Heney, N. M., S. Ahmed, M. J. Flanagan, W. Frable, M. P. Corder, M. D. Hafermann and I. R. Hawkins (1983). "Superficial bladder cancer: progression and recurrence." *J Urol* 130(6): 1083-6.
- Hoffman, D., Y. Masuda and E. L. Wynder (1969). "Alpha-naphthylamine and beta-naphthylamine in cigarette smoke." *Nature* 221(177): 255-6.
- Huang, W. C., S. Taylor, T. B. Nguyen, J. E. Tomaszewski, J. A. Libertino, S. B. Malkowicz and T. W. McGarvey (2002). "KIAA1096, a gene on chromosome

1q, is amplified and overexpressed in bladder cancer." *DNA Cell Biol* 21(10): 707-15.

Jocham, D. (2003). *Maligne Tumore der Harnblase*. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.

Kadlubar, F. F., J. A. Miller and E. C. Miller (1978). "Guanyl O6-arylation and O6-arylation of DNA by the carcinogen N-hydroxy-1-naphthylamine." *Cancer Res* 38(11 Pt 1): 3628-38.

Kadlubar, F. F., L. E. Unruh, T. J. Flammang, D. Sparks, R. K. Mitchum and G. J. Mulder (1981). "Alteration of urinary levels of the carcinogen, N-hydroxy-2-naphthylamine, and its N-glucuronide in the rat by control of urinary pH, inhibition of metabolic sulfation, and changes in biliary excretion." *Chem Biol Interact* 33(2-3): 129-47.

Kagan, J., J. Liu, J. D. Stein, S. S. Wagner, R. Babkowski, B. H. Grossman and R. L. Katz (1998). "Cluster of allele losses within a 2.5 cM region of chromosome 10 in high-grade invasive bladder cancer." *Oncogene* 16(7): 909-13.

Kausch, I. and A. Bohle (2003). "[Non-invasive urinary diagnosis of bladder cancer. What do we know?]." *Urologe A* 42(7): 912-21.

Kimura, F., A. R. Florl, H. H. Seifert, J. Louhelainen, S. Maas, M. A. Knowles and W. A. Schulz (2001). "Destabilization of chromosome 9 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder." *Br J Cancer* 85(12): 1887-93.

Klan, R., V. Loy and H. Huland (1991). "Residual tumor discovered in routine second transurethral resection in patients with stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder." *J Urol* 146(2): 316-8.

Knowles, M. A. (1999a). "The genetics of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application." *BJU Int* 84(4): 412-27.

- Knowles, M. A. (1999b). "Identification of novel bladder tumour suppressor genes." *Electrophoresis* 20(2): 269-79.
- Knowles, M. A. (2001). "What we could do now: molecular pathology of bladder cancer." *Mol Pathol* 54(4): 215-21.
- Koontz, W. W., Jr., N. M. Heney, M. S. Soloway, L. Kluskens, T. A. Hazra, D. L. Trump and B. Barton (1985). "Mitomycin for patients who have failed on thiotepa. The National Bladder Cancer Group." *Urology* 26(4 Suppl): 30-1.
- Kriegmair, M., R. Baumgartner, H. Stepp, R. Knüchel and A. Hofstetter (1998). *Die in vivo Fluoreszenzmarkierung urothelialer Neoplasien der Harnblase*. Reinbek, Einhorn-Press Verlag GmbH.
- Kuczyk, M. A., J. Serth, C. Hervatin, H. Arndt, L. Derendorf, W. F. Thon and U. Jonas (1994). "Detection of P53 tumor-suppressor-gene protein in bladder tumors and prostate cancer: possible clinical implications." *World J Urol* 12(6): 345-51.
- Kumar, R. (1989). "The technique of Polymerase Chain Reaktion." *Technique, a Journal of methods in cell and molekular biology* 1(3): 133-152.
- Kurth, K., L. Denis, R. Sylvester and M. de Pauw (1992). "The natural history and the prognosis of treated superficial bladder cancer. EORTC GU Group." *Prog Clin Biol Res* 378: 1-7.
- Lamm, D. L. (1992). "Carcinoma in situ." *Urol Clin North Am* 19(3): 499-508.
- Leitch, A. R., T. Schwarzbacher, D. Jackson and I. J. Leitch (1994). *In Situ-Hybridisierung*. Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.
- Linz, U. and H. Degenhardt (1990). "Die Polymerasekettenreaktion." *Naturwissenschaften* 77: 515-530.

- Lipponen, P., S. Aaltoma, V. M. Kosma, M. Ala-Opas and M. Eskelinen (1998). "Expression of CD44 standard and variant-v6 proteins in transitional cell bladder tumours and their relation to prognosis during a long-term follow-up." *J Pathol* 186(2): 157-64.
- Lipponen, P. K. and M. J. Eskelinen (1995). "Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrence in bladder cancer." *J Cancer Res Clin Oncol* 121(5): 303-8.
- Lutzeyer, W., H. Rubben and H. Dahm (1982). "Prognostic parameters in superficial bladder cancer: an analysis of 315 cases." *J Urol* 127(2): 250-2.
- Mellon, K., C. Wright, P. Kelly, C. H. Horne and D. E. Neal (1995). "Long-term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer." *J Urol* 153(3 Pt 2): 919-25.
- Messing, E. M. and W. Catalona (1997). *Urothelial tumors of the urinary tract*. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, W.B. Saunders Company.
- Miyao, N., Y. C. Tsai, S. P. Lerner, A. F. Olumi, C. H. Spruck, 3rd, M. Gonzalez-Zulueta, P. W. Nichols, D. G. Skinner and P. A. Jones (1993). "Role of chromosome 9 in human bladder cancer." *Cancer Res* 53(17): 4066-70.
- Moch, H., G. Sauter, M. J. Mihatsch, F. Gudat, R. Epper and F. M. Waldman (1994). "p53 but not erbB-2 expression is associated with rapid tumor proliferation in urinary bladder cancer." *Hum Pathol* 25(12): 1346-51.
- Morrison, A. S. (1984). "Advances in the etiology of urothelial cancer." *Urol Clin North Am* 11(4): 557-66.
- Morrison, A. S. and P. Cole (1976). "Epidemiology of bladder cancer." *Urol Clin North Am* 3(1): 13-29.

- Nelde, H. J., F. S. Krause, G. Feil, H. W. Wechsel and K.-H. Bichler (1998).
Urinzytologie beim Harnblasenkarzinom. Reinbek, Einhorn-Presse Verlag
GmbH.
- Neuhaus, M., U. Wagner, U. Schmid, D. Ackermann, T. Zellweger, R. Maurer, G.
Alund, H. Knonagel, M. Rist, H. Moch, M. J. Mihatsch, T. C. Gasser and G.
Sauter (1999). "Polysomies but not Y chromosome losses have prognostic
significance in pTa/pT1 urinary bladder cancer." *Hum Pathol* 30(1): 81-6.
- Obermann, E. C., K. Junker, R. Stoehr, W. Dietmaier, D. Zaak, J. Schubert, F.
Hofstaedter, R. Knuechel and A. Hartmann (2003). "Frequent genetic
alterations in flat urothelial hyperplasias and concomitant papillary bladder
cancer as detected by CGH, LOH, and FISH analyses." *J Pathol* 199(1): 50-7.
- Ohgaki, K., A. Iida, O. Ogawa, Y. Kubota, M. Akimoto and M. Emi (1999).
"Localization of tumor suppressor gene associated with distant metastasis of
urinary bladder cancer to a 1-Mb interval on 8p22." *Genes Chromosomes
Cancer* 25(1): 1-5.
- Olumi, A. F., Y. C. Tsai, P. W. Nichols, D. G. Skinner, D. R. Cain, L. I. Bender and P.
A. Jones (1990). "Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade
from low grade transitional cell carcinomas of the bladder." *Cancer Res*
50(21): 7081-3.
- Orlow, I., H. LaRue, I. Osman, L. Lacombe, L. Moore, F. Rabbani, F. Meyer, Y.
Fradet and C. Cordon-Cardo (1999). "Deletions of the INK4A gene in
superficial bladder tumors. Association with recurrence." *Am J Pathol* 155(1):
105-13.
- Pagano, F., A. Garboglio, C. Milani, P. Bassi and V. Pegoraro (1987). "Prognosis of
bladder cancer. I. Risk factors in superficial transitional cell carcinoma." *Eur
Urol* 13(3): 145-9.

- Paiss, T., G. Wöhr, R. E. Hautmann, T. Mattfeldt, M. Müller, J. Haeussler and W. Vogel (2002). "Some tumors of the bladder are polyclonal in origin." *J Urol* 167(2 Pt 1): 718-23.
- Parmar, M. K., L. S. Freedman, T. B. Hargreave and D. A. Tolley (1989). "Prognostic factors for recurrence and followup policies in the treatment of superficial bladder cancer: report from the British Medical Research Council Subgroup on Superficial Bladder Cancer (Urological Cancer Working Party)." *J Urol* 142(2 Pt 1): 284-8.
- Pfister, C., L. Moore, P. Allard, H. Larue, L. Lacombe, B. Tetu, F. Meyer and Y. Fradet (1999). "Predictive value of cell cycle markers p53, MDM2, p21, and Ki-67 in superficial bladder tumor recurrence." *Clin Cancer Res* 5(12): 4079-84.
- Pich, A., L. Chiusa, A. Formiconi, D. Galliano, P. Bortolin, A. Comino and R. Navone (2002). "Proliferative activity is the most significant predictor of recurrence in noninvasive papillary urothelial neoplasms of low malignant potential and grade 1 papillary carcinomas of the bladder." *Cancer* 95(4): 784-90.
- Piper, J. M., J. Tonascia and G. M. Matanoski (1985). "Heavy phenacetin use and bladder cancer in women aged 20 to 49 years." *N Engl J Med* 313(5): 292-5.
- Proctor, A. J., L. M. Coombs, J. P. Cairns and M. A. Knowles (1991). "Amplification at chromosome 11q13 in transitional cell tumours of the bladder." *Oncogene* 6(5): 789-95.
- Prout, G. R., Jr., P. P. Griffin, J. J. Daly and N. M. Heney (1983). "Carcinoma in situ of the urinary bladder with and without associated vesical neoplasms." *Cancer* 52(3): 524-32.
- Puente, D., N. Malats, L. Cecchini, A. Tardon, R. Garcia-Closas, C. Serra, A. Carrato, M. Sala, R. Boixeda, M. Dosemeci, F. X. Real and M. Kogevinas (2003). "Gender-related differences in clinical and pathological characteristics and therapy of bladder cancer." *Eur Urol* 43(1): 53-62.

- Pycha, A., C. Mian, A. Haitel, J. Hofbauer, H. Wiener and M. Marberger (1997). "Fluorescence in situ hybridization identifies more aggressive types of primarily noninvasive (stage pTa) bladder cancer." *J Urol* 157(6): 2116-9.
- Pycha, A., C. Mian, J. Hofbauer, C. Brossner, A. Haitel, H. Wiener and M. Marberger (1999). "Multifocality of transitional cell carcinoma results from genetic instability of entire transitional epithelium." *Urology* 53(1): 92-7.
- Rathert, P. (2003). "[Urinary cytology in cases of bladder cancer: a critical evaluation]." *Urologe A* 42(7): 908-11.
- Richter, J., F. Jiang, J. P. Gorog, G. Sartorius, C. Egenter, T. C. Gasser, H. Moch, M. J. Mihatsch and G. Sauter (1997). "Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization." *Cancer Res* 57(14): 2860-4.
- Risch, A., D. M. Wallace, S. Bathers and E. Sim (1995). "Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer." *Hum Mol Genet* 4(2): 231-6.
- Roehrborn, C. G., A. I. Sagalowsky and P. C. Peters (1991). "Long-term patient survival after cystectomy for regional metastatic transitional cell carcinoma of the bladder." *J Urol* 146(1): 36-9.
- Sandberg, A. A. and C. S. Berger (1994). "Review of chromosome studies in urological tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer." *J Urol* 151(3): 545-60.
- Sarkis, A. S., G. Dalbagni, C. Cordon-Cardo, Z. F. Zhang, J. Sheinfeld, W. R. Fair, H. W. Herr and V. E. Reuter (1993). "Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression." *J Natl Cancer Inst* 85(1): 53-9.

- Sauter, G. and M. J. Mihatsch (1998). "Pussycats and baby tigers: non-invasive (pTa) and minimally invasive (pT1) bladder carcinomas are not the same!" J Pathol 185(4): 339-41.
- Schmetter, B. S., K. K. Habicht, D. L. Lamm, A. Morales, N. H. Bander, H. B. Grossman, M. G. Hanna, Jr., S. R. Silberman and B. T. Butman (1997). "A multicenter trial evaluation of the fibrin/fibrinogen degradation products test for detection and monitoring of bladder cancer." J Urol 158(3 Pt 1): 801-5.
- Schmitz-Dräger B.J., V. R. C. R. C., Gerharz C.-D., Bültel H, Grimm M.-O. (1995). "P53-Akkumulation und c-myc-Überexpression beim Urothelkarzinom." Akt. Urol. 26: 93-95.
- Schulz, W. A., F. Jankevicius, C. D. Gerharz, M. Kushima, C. van Roeyen, H. Bultel, P. Gobell and B. J. Schmitz-Drager (1998). "Predictive value of molecular alterations for the prognosis of urothelial carcinoma." Cancer Detect Prev 22(5): 422-9.
- Sgambato, A., M. Migaldi, B. Faraglia, L. Garagnani, G. Romano, C. De Gaetani, P. Ferrari, G. Capelli, G. P. Trentini and A. Cittadini (1999). "Loss of P27Kip1 expression correlates with tumor grade and with reduced disease-free survival in primary superficial bladder cancers." Cancer Res 59(13): 3245-50.
- Shaw, M. E. and M. A. Knowles (1995). "Deletion mapping of chromosome 11 in carcinoma of the bladder." Genes Chromosomes Cancer 13(1): 1-8.
- Shin, K. Y., G. Kong, W. S. Kim, T. Y. Lee, Y. N. Woo and J. D. Lee (1997). "Overexpression of cyclin D1 correlates with early recurrence in superficial bladder cancers." Br J Cancer 75(12): 1788-92.
- Sidransky, D., P. Frost, A. Von Eschenbach, R. Oyasu, A. C. Preisinger and B. Vogelstein (1992). "Clonal origin bladder cancer." N Engl J Med 326(11): 737-40.

- Sidransky, D., A. Von Eschenbach, Y. C. Tsai, P. Jones, I. Summerhayes, F. Marshall, M. Paul, P. Green, S. R. Hamilton, P. Frost and et al. (1991). "Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples." *Science* 252(5006): 706-9.
- Silverman, D. T., P. Hartge, A. S. Morrison and S. S. Devesa (1992). "Epidemiology of bladder cancer." *Hematol Oncol Clin North Am* 6(1): 1-30.
- Simon, R., H. Burger, C. Brinkschmidt, W. Bocker, L. Hertle and H. J. Terpe (1998). "Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer." *J Pathol* 185(4): 345-51.
- Simoneau, A. R., C. H. Spruck, 3rd, M. Gonzalez-Zulueta, M. L. Gonzalgo, M. F. Chan, Y. C. Tsai, M. Dean, K. Steven, T. Horn and P. A. Jones (1996). "Evidence for two tumor suppressor loci associated with proximal chromosome 9p to q and distal chromosome 9q in bladder cancer and the initial screening for GAS1 and PTC mutations." *Cancer Res* 56(21): 5039-43.
- Simoneau, M., T. O. Aboukassim, H. LaRue, F. Rousseau and Y. Fradet (1999). "Four tumor suppressor loci on chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two novel candidate regions at 9q22.3 and 9q31." *Oncogene* 18(1): 157-63.
- Smith, J. A., Jr. and W. F. Whitmore, Jr. (1981). "Regional lymph node metastasis from bladder cancer." *J Urol* 126(5): 591-3.
- Spruck, C. H., 3rd, P. F. Ohneseit, M. Gonzalez-Zulueta, D. Esrig, N. Miyao, Y. C. Tsai, S. P. Lerner, C. Schmutte, A. S. Yang, R. Cote and et al. (1994). "Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder." *Cancer Res* 54(3): 784-8.
- Stein, J. P., G. D. Grossfeld, D. A. Ginsberg, D. Esrig, J. A. Freeman, A. J. Figueroa, D. G. Skinner and R. J. Cote (1998). "Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature." *J Urol* 160(3 Pt 1): 645-59.

- Swana HS, G. D., Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. (1999). "Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer." *N Engl J Med.* 341(6): 452-3.
- Takahashi, T., T. Habuchi, Y. Kakehi, K. Mitsumori, T. Akao, T. Terachi and O. Yoshida (1998). "Clonal and chronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract." *Cancer Res* 58(24): 5835-41.
- Telenius, H., A. H. Pelmear, A. Tunnacliffe, N. P. Carter, A. Behmel, M. A. Ferguson-Smith, M. Nordenskjold, R. Pfragner and B. A. Ponder (1992). "Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes." *Genes Chromosomes Cancer* 4(3): 257-63.
- Toma, V., D. Hauri, U. Schmid, D. Ackermann, R. Maurer, G. Alund, H. Knonagel, M. Rist, T. C. Gasser, G. Sauter and J. Roth (1999). "Focal loss of CD44 variant protein expression is related to recurrence in superficial bladder carcinoma." *Am J Pathol* 155(5): 1427-32.
- Tsai, Y. C., P. W. Nichols, A. L. Hiti, Z. Williams, D. G. Skinner and P. A. Jones (1990). "Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer." *Cancer Res* 50(1): 44-7.
- van Tilborg, A. A., A. de Vries, M. de Bont, L. E. Groenfeld, T. H. van der Kwast and E. C. Zwarthoff (2000). "Molecular evolution of multiple recurrent cancers of the bladder." *Hum Mol Genet* 9(20): 2973-80.
- van Tilborg, A. A., A. de Vries, M. de Bont, L. E. Groenfeld and E. C. Zwarthoff (2002). "The random development of LOH on chromosome 9q in superficial bladder cancers." *J Pathol* 198(3): 352-8.
- van Tilborg, A. A., L. E. Groenfeld, T. H. van der Kwast and E. C. Zwarthoff (1999). "Evidence for two candidate tumour suppressor loci on chromosome 9q in transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder but no homozygous deletions in bladder tumour cell lines." *Br J Cancer* 80(3-4): 489-94.

- Van Tilborg, A. A., A. C. Hekman, K. J. Vissers, T. H. van der Kwast and E. C. Zwarthoff (1998). "Loss of heterozygosity on chromosome 9 and loss of chromosome 9 copy number are separate events in the pathogenesis of transitional cell carcinoma of the bladder." *Int J Cancer* 75(1): 9-14.
- Wagener, C. (1999). 7. Zellzyklus und Apoptose. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- Waldman, F. M., P. R. Carroll, R. Kerschmann, M. B. Cohen, F. G. Field and B. H. Mayall (1991). "Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer." *Cancer Res* 51(14): 3807-13.
- Watters, A. D., S. A. Ballantyne, J. J. Going, K. M. Grigor and J. M. Bartlett (2000). "Aneusomy of chromosomes 7 and 17 predicts the recurrence of transitional cell carcinoma of the urinary bladder." *BJU Int* 85(1): 42-7.
- Watters, A. D., J. J. Going, K. M. Grigor and J. M. Bartlett (2002). "Progression to detrusor-muscle invasion in bladder carcinoma is associated with polysomy of chromosomes 1 and 8 in recurrent pTa/pT1 tumours." *Eur J Cancer* 38(12): 1593-9.
- Wittekind, C. and H. Nenning (1997). "Pathologie und Prognosefaktoren des Harnblasenkarzinoms." *Onkologie* 3: 227-235.
- Wright, P. A. and D. Wynford-Thomas (1990). "The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research." *J Pathol* 162(2): 99-117.
- Yan, Y., G. L. Andriole, P. A. Humphrey and A. S. Kibel (2002). "Patterns of multiple recurrences of superficial (Ta/T1) transitional cell carcinoma of bladder and effects of clinicopathologic and biochemical factors." *Cancer* 95(6): 1239-46.
- Zaak, D., E. Hungerhuber, P. Schneede, H. Stepp, D. Frimberger, S. Corvin, N. Schmeller, M. Kriegmair, A. Hofstetter, R. Knuechel and R. Knochel (2002).

"Role of 5-aminolevulinic acid in the detection of urothelial premalignant lesions." *Cancer* 95(6): 1234-8.

Zhao, J., J. Richter, U. Wagner, B. Roth, P. Schraml, T. Zellweger, D. Ackermann, U. Schmid, H. Moch, M. J. Mihatsch, T. C. Gasser and G. Sauter (1999).
"Chromosomal imbalances in noninvasive papillary bladder neoplasms (pTa)." *Cancer Res* 59(18): 4658-61.

Zincke, H., D. C. Utz and G. M. Farrow (1985). "Review of Mayo Clinic experience with carcinoma in situ." *Urology* 26(4 Suppl): 39-46.

Zlotta, A. R., J. C. Noel, I. Fayt, A. Drowart, J. P. Van Vooren, K. Huygen, J. Simon and C. C. Schulman (1999). "Correlation and prognostic significance of p53, p21WAF1/CIP1 and Ki-67 expression in patients with superficial bladder tumors treated with bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy." *J Urol* 161(3): 792-8.

Anhang

Tab. 8 Patienten mit Rezidivzahl, Tumorgad, Geschlecht und Chromosomenveränderungen

Patient	Rezidive	Grad	Geschlecht	Chromosomen- veränderungen
9	0	1	f	enh17
2BLNR	0	1	f	dim2q21q22, enh6q24, enh8p, enh9(p-q21), enh15q, enh16. enh17, enh18p
27	0	1	m	dim6p22pter, dim9, dim18q22
1BLNR	0	1	m	dim3p, dim17
p56	0	1	m	
6	0	1	m	dim9, enh17
14	0	1	m	dim9
23	0	1	m	enh8q, dim9q31, enh15, dimY
p106	0	1	m	
p53	0	1	m	dim9q21qter, enh13q21.2q31, enh15q
1	0	1	m	dim9q21qter, dimY
p209	0	1	m	
10	0	1	m	dim2q31qter, dim6q, dim9, dim11p, enh12, dim13q14, dim14q24, dimY
p47	0	1	m	dim9q21qter, enh13q
p32	0	1	m	dim9q, dimY
p179	0	1	m	enh1q25q41, dim8p11.2p24, dim9, dim17p
3	0	1	m	dim9q22qter
p72	0	2	f	enh1 dim9, dim11
p60	0	2	f	dim1p, enh8, dim10q22qter, dim17p, dim18q
p40	0	2	f	dim20p, dup20q
FE200	0	2	f	
22	0	2	m	dim18q
p283	0	2	m	dim9, dim11p, enh13q
p3	0	2	m	
p37	0	2	m	enh1q24qter, del16p
17	1	1	f	enh3q22q29, dim6q, dim9p21
FE27	2	1	f	
FE7	2	1	f	enh1q12q31, dim9, dim10q
19	>20	1	f	dim1p31p32, dim9q21qter
5	1	1	m	
21	1	1	m	dim9, dim18
FE/SE1	1	1	m	dim9q, enh17p, enh20q, dimY
13	1	1	m	dim9q, enh10q14, enh21
FE/M1-2	1	1	m	enh17
FE/K1	2	1	m	dimY
p270	2	1	m	dim9q, dim10q
FE/L1	2	1	m	dim8p, dim9q, enh13, dim14q22q31, dimY
18	3	1	m	dim9, enh17q, dimY
15	3	1	m	dim10q24
FE77	3	1	m	enh1q, enh8q, dim11q14qter, dimY
FE15	5	1	m	enh8, dim9q, enh17q21qter
20	9	1	m	dim9pterq33, amp11q13;dim(11p,11q14qter), dim13, enh17
FE/S1	1	1	m	dimp32, dim2q12q32, dim5q23qter, dim(9p, 9q21qter), del p, enh13, dim14q21qter
11	1	2	f	dim9
4	2	2	f	dim5q31q33, dim8p, dim9q21qter, dim10q24, del p11, enh12q14q15, enh17q, dim18, enh20q, enh21
12	4	2	f	dim9, dim10q23q26, del11,dup11q13, enh13q22
7	4	2	f	
FE6	2	2	f	dim9, enh14pterq22
FE/D1	1	2	m	del q11q13, amp17q22q24

Patient	Rezidive	Grad	Geschlecht	Chromosomen- veränderungen
FE/B1	1	2	m	
FE/F1	5	2	m	dim9q
24	6	2	m	enh1q31qter, dim6q22qter, dim9q32, dimY
5BLNR	1	2	m	enh8q

Tab. 9 Beobachtungszeiträume, rezidivfreie Zeiten, Zahl Primärtumore und Größe der Tumore

Patient	Beobachtungszeit- raum bei nicht- rezidivierenden Tumoren (Monate)	durchschnittliche rezidivfreie Zeit (Monate)	Zahl Primärtumore	Größe größter Primärtumor (mm)
9	93		1	20
2BLNR	99		1	35
27	90		1	5
1BLNR	79		1	6
p56	54		1	10
6	110		1	10
14	93		1	20
23	60		1	20
p106	47		1	20
p53	55		1	20
1	110		1	35
p209	39		2	6
10	95		2	10
p47	56		2	15
p32	58		2	30
p179	42		>5	10
3	110		>5	100
p72	52		1	20
p60	54		>5	100
p40	47		1	10
FE200	40		1	25
22	74		1	15
p283	33		1	20
p3	97		1	30
p37	58		2	10
17		18	1	5
FE27		20	2	40
FE7		4	>5	100
19		3	>5	5
5		84	1	10
21		10	1	15
FE/SE1		9	1	20
13		2	3	10
FE/M1-2		6	>5	100
FE/K1		20	1	35
p270		32	2	20
FE/L1		17	>5	10
18		19	1	35
15		12	1	5
FE77		4	>5	50
FE15		3	1	10
20		6	>5	50
FE/S1		3	nicht bekannt	nicht bekannt
11		17	4	20
4		6	>5	35
12		7	1	20
7		8	>5	10
FE6		32	1	20
FE/D1		27	1	40
FE/B1		5	5	10
FE/F1		13	>5	35
24		8	1	25
5BLNR		53	1	20

Lebenslauf

Kujau, Holger

Geburtsdatum 25.10.1972	Geburtsort Gera
1979 - 1989	Schulbesuch (Polytechnische Oberschule)
1989 - 1991	Erweiterte Oberschule
1991	Abitur
1991 – 1992	Zivildienst
1992 - 1999	Studium der Medizin an der FSU Jena
08.06.1999	3. Staatsexamen des Medizinstudiums
Ab 01.07.1999	Arzt im Praktikum und anschließend ab 01.01.2001 Arzt in Weiterbildung an der Urologischen Klinik Gera

Jena, den 15.01.2005

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. K. Junker für die Überlassung des Promotions-themas und die freundliche Hilfestellung zum Verständnis der Grundlagen und praktischen Durchführung der Laborarbeit sowie Auswertung und Interpretation der Daten.

Ich danke Herrn Univ. Prof. Dr. med. habil. J. Schubert für die Überlassung der Räumlichkeiten und Materialien des Forschungslabors der Urologischen Klinik.

Einen besonderen Dank möchte ich den MTA des Forschungslabors aussprechen, welche mich immer sehr freundlich bei der Laborarbeit unterstützt haben.

Nun natürlich ein großer Dank meiner Familie und meinen Freunden, welche sicher mindestens wie ich der Fertigstellung dieser Arbeit entgegenfieberten.

Manja gab viel Kraft und Liebe, Kaffee inbegriffen, ein Dank ist kaum in Worte zu fassen. Und für den Schlußspurt kam Hannes gerade recht.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau PD Dr. Kerstin Junker.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

daß ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 15.01.2005